

**Einfluss des Proteins p8 auf das Immunsystem im Verlauf der  
akuten Pankreatitis im Mausmodell**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

Eingereicht von: Tilmann Cornelius Schlaich  
geboren am 17.08.1984 in Böblingen

Angefertigt an: Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie  
Department für Innere Medizin, Neurologie und  
Dermatologie, Universitätsklinikum Leipzig

Betreuer: PD Dr. med. habil. Albrecht Hoffmeister  
Prof. Dr. med. Joachim Mössner  
Dr. med. Sebastian Weis

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 23.06.2015

---

Meinen Eltern

## Vorbemerkung

Für diese Dissertationsschrift wurde die Form der Publikationspromotion gewählt. Die hierfür benötigte Publikation ist im November 2014 in *Pancreas* erschienen. Die eingefügte Originalveröffentlichung enthält die verwendeten Materialien und Methoden sowie eine Beschreibung der Ergebnisse mit ausführlicher Diskussion.

Bibliographischer Nachweis der Publikation:

Weis, S\*, Schlaich, TC\*, Dehghani, F, Carvalho, T, Sommerer, I, Fricke, S, Kahlenberg, F, Mössner, J und Hoffmeister, A 2014 'p8 Deficiency Causes Siderosis in Spleens and Lymphocyte Apoptosis in Acute Pancreatitis', *Pancreas*, vol. 43, no. 8, pp. 1277-1285.

\*geteilte Erstauterschaft

## Bibliographische Beschreibung

Name: Tilmann Cornelius Schlaich

Titel: Einfluss des Proteins p8 auf das Immunsystem im Verlauf der akuten Pankreatitis im Mausmodell

Universität Leipzig, Dissertation

51 S., 133 Lit., 1 Abb.

### Referat

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine mehrheitlich durch Gallensteine und Alkoholabusus ausgelöste Entzündung der Bauchspeicheldrüse. Pathophysiologisch bedingt der Schaden der Pankreasazinuszellen eine lokale und systemische immunologische Reaktion. Das Stressprotein p8 kann die pankreatische Gewebeschädigung im Tiermodell mildern und den Verlauf der AP positiv beeinflussen. Ein ursächlicher Zusammenhang bzw. Einfluss von p8 auf die systemischen inflammatorischen Abläufe während der AP ist bisher nicht untersucht worden. Diese Dissertation greift die postulierte protektive Wirkung von p8 auf und sollte einen modulierenden Einfluss von p8 auf das Immunsystem während der AP prüfen. Hierzu wurden Untersuchungen am Mausmodell durchgeführt. Es erfolgte eine Immunphänotypisierung zunächst am naiven Immunsystem und anschließend zu definierten Zeitpunkten direkt nach Induktion der AP mittels Caerulein-Injektionen sowie nach Abklingen der Entzündung (Immunrekonstitution). Die Versuche erfolgten vergleichend an einer etablierten *p8*-knock-out-Mauslinie (*p8*<sup>-/-</sup>) und an einer Wildtyp-Kontrollgruppe. Eingeschlossen waren histologische und immunhistochemische Untersuchungen verschiedener Organe, laborchemische Analysen und eine durchflusszytometrische Phänotypisierung. Unter *p8*-Defizienz zeigte sich ein regelrecht entwickeltes Organ- und Immunsystem. Im Alter entwickelten *p8*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine signifikante Splenomegalie mit vermehrter extramedullärer Hämatopoese unklarer Genese. Nach Auslösen der AP bestätigte sich bei *p8*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine schwerere Akutphase. Dies manifestierte sich sowohl in der Histopathologie als auch in den durchflusszytometrischen Analysen aus Vollblut- und Milzzellen. Die postinflammatorische Immunrekonstitution ging einher mit Strukturverlust der weißen Milzpulpa und darin vermehrtem Vorkommen lymphozytärer Apoptosen. Da ein Einfluss von p8 auf Apoptose bisher nur aus anderem Kontext bekannt ist, kann für p8 erstmals eine anti-apoptotische Wirkung auf aktivierte Milzlymphozyten bei der Pankreatitis postuliert werden. Der Zusammenhang mit dem stärkeren inflammatorischen Verlauf sowie mögliche molekulare und genetische Signalwege sollten weiter untersucht werden.

# Inhaltsverzeichnis

Vorbemerkung .....	I
Bibliographische Beschreibung .....	II
Inhaltsverzeichnis .....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung - die akute Pankreatitis .....	1
1.1 Pathophysiologische Aspekte der akuten Pankreatitis .....	2
1.1.1 Frühe zellschädigende Prozesse innerhalb der Azinuszelle .....	2
1.1.2 Lokale Aktivierung und Einbeziehung des Immunsystems .....	3
1.1.3 Immunologische Dysregulation auf systemischer Ebene .....	4
1.1.4 Veränderungen im lymphozytären System während der AP .....	6
2 Das Protein p8 .....	8
2.1 p8 und die akute Pankreatitis .....	8
2.2 Der Einfluss von p8 auf apoptotische Prozesse .....	10
3 Zielstellung der Arbeit .....	11
4 Publikation .....	14
5 Zusammenfassung .....	24
6 Literaturverzeichnis .....	29
7 Eigenanteilsnachweis .....	38
8 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit .....	40
9 Curriculum vitae .....	41
10 Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit .....	43
11 Danksagung .....	44

## Abkürzungsverzeichnis

AICD	activation induced cell death
ALAT	Alanin-Aminotransferase
AP	akute Pankreatitis
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BM	bone marrow
CARS	compensatory antiinflammatory response syndrome
CBA	Cytometric bead array
CD	cluster of differentiation
com-1	candidate of metastasis
Da	Dalton
EMH	extramedulläre Hämatopoese
FACS	fluorescence activated cell sorting
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HMG	high mobility group
HO-1	Hämoxygenase 1
ICAM	intercellular adhesion molecule
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IFN	Interferon
kDa	kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
MCP	monocyte chemoattractant protein
MODS	Multiorgandysfunktionssyndrom
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
NLS	nuclear localization sequence

NO	Nitric oxide
NUPR-1	nuclear protein 1
$p8^{-/-}$	C57BL/6J-Mauslinie mit homozygotem $p8$ -Gen-knock-out
$p8^{+/+}$	C57BL/6J-Wildtypmauslinie
PAP	Pankreatitis-assoziiertes Protein
PSC	pancreatic stellate cells
SAP	schwere akute Pankreatitis
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
sog.	sogenannt
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
T <sub>regs</sub>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> FoxP3 <sup>+</sup> regulatorische T-Lymphozyten
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
$\gamma$ -GT	gamma-Glutamyltransferase

## 1 Einleitung - die akute Pankreatitis

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine plötzlich auftretende, schmerzhafte Entzündung der Bauchspeicheldrüse und im europäischen Raum mit einer geschätzten Inzidenz zwischen 10 und 46 Fällen/100.000 Erwachsenen eine relativ häufige Erkrankung in der Gastroenterologie (Mayerle & Lerch 2001). Ätiologisch ist die AP mehrheitlich auf ein Gallensteinleiden oder übermäßigen Alkoholkonsum zurückzuführen (Steinberg 1994; Spanier, Dijkgraaf & Bruno 2008; Wang et al. 2009). In den letzten beiden Jahrzehnten war in der westlichen Welt ein Anstieg der Inzidenz zu verzeichnen, wobei als einer der Gründe hierfür eine Zunahme der Prävalenz von Gallensteinen in der Bevölkerung diskutiert wird (Tonsi et al. 2009; Frossard, Steer & Pastor 2008). Seltener Ursachen der AP sind Stoffwechselstörungen wie Hyperkalziämie oder Hypertriglyzeridämie, Arzneimittelnebenwirkungen, iatrogen nach endoskopisch-retrograder Cholangiopankreatographie, Infektionen durch Coxsackie- oder Mumpsviren sowie genetische oder autoimmune Erkrankungen (Tonsi et al. 2009; Khan, Latif & Eloubeidi 2010). Meist nimmt die AP einen selbstlimitierenden Verlauf mit geringer Sterblichkeit (Wilson, Manji & Neoptolemos 1998). Bei etwa 20% der Patienten tritt jedoch eine schwere akute Pankreatitis (SAP) auf (Frossard, Steer & Pastor 2008), die definitionsgemäß wenigstens ein begleitendes Organversagen über mindestens 48 Stunden Dauer umfasst (Banks et al. 2012) und trotz Fortschritten in der intensivmedizinischen Versorgung bei Fehlen einer kausalen Therapie mit einer deutlich höheren Letalität verbunden ist (Halonen et al. 2002; Pandol et al. 2007). Experimentell konnte gezeigt werden, dass mehr noch als die frühe Schädigung des Pankreas die komplexe Beteiligung des Immunsystems, auf die noch näher eingegangen wird, einen entscheidenden Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat (Mora et al. 1997; Bhatia et al. 2000; Kylänpää, Repo & Puolakkainen 2010; Mayerle 2009). Dies wurde auch durch Untersuchungen an Patienten mit AP bestätigt (Pietruczuk et al. 2006; Shen et al. 2011). Die Einzelheiten der Immundysregulation bei AP und SAP sind nach wie vor unvollständig aufgeklärt und Gegenstand aktueller Forschung (Zhang et al. 2009). Zudem scheiterten bisher in der klinischen Anwendung sämtliche therapeutische Versuche zur Immunmodulation (Bang et al. 2008; Mayerle et al. 2012). Das Erkennen weiterer Aspekte der pathophysiologischen Prozesse könnte dazu führen, doch ein spezifisches Eingreifen zu ermöglichen, um den Krankheitsverlauf zu mildern und damit die Prognose der Erkrankung verbessern zu können.



## **1.1 Pathophysiologische Aspekte der akuten Pankreatitis**

### **1.1.1 Frühe zellschädigende Prozesse innerhalb der Azinuszelle**

Als pathophysiologischer Ausgangspunkt der AP wird die vorzeitige, innerhalb der Azinuszellen stattfindende Aktivierung verschiedener pankreatischer Verdauungsenzyme wie Trypsin, Chymotrypsin, Lipase, Amylase, Elastase, u.a. diskutiert (Mitchell, Byrne & Baillie 2003; Vonlaufen, Wilson & Apte 2008). Diese Enzyme sind physiologisch nach ihrer Synthese zunächst in inaktiver Form als sog. Proenzyme oder Zymogene in intrazellulären Vesikel gespeichert (Neurath & Walsh 1976). Erst nach deren Sekretion über den Pankreasgang ins Duodenum werden sie dort u.a. durch Trypsin, welches zuvor durch die duodenale Enterokinase aktiviert wird, in ihre aktive Form überführt (Mössner 2011).

Im Rahmen der AP kommt es aufgrund verschiedener schädigender Einflüsse jedoch noch innerhalb des Pankreas zur Aktivierung der eigentlich für den Export bestimmten Enzyme (Bhatia et al. 2005). Es wird dabei angenommen, dass bei der biliären Pankreatitis Gallensteine durch Gangverschluss einen Aufstau des Pankreassekrets bewirken und sekundär eine geordnete Exozytose gestört wird (Saluja et al. 1989). Bei der ethyltoxisch bedingten AP sollen u.a. Stoffwechselmetaboliten des Ethanol zu einer Membranschädigung und Destabilisierung der enzymespeichernden Zellorganellen führen (Vonlaufen, Wilson & Apte 2008; Wilson & Apte 2003). In gemeinsamer Endstrecke kommen die verdauungsenzymhaltigen Vesikel mit Lysosomen und deren Proteasen durch Fusion in direkten Kontakt, wobei u.a. lysosomales Cathepsin B Trypsinogen zu Trypsin aktiviert (Greenbaum, Hirshkowitz & Shoichet 1959; Mössner 2011; Saluja et al. 1997). Trypsin ist in der Lage, neben seiner Autoaktivierung viele weitere der freigesetzten Proenzyme zu aktivieren, wodurch schließlich der Kontrollverlust über die Proteaseinhibition nicht mehr aufgefangen werden kann und die intrazelluläre Homöostase verloren geht (Frossard & Pastor 2002). Das Resultat dieser Autokatalyse und Kettenreaktion ist eine beginnende Autolyse mit Übergreifen auf die benachbarten Pankreaszellen. Die strukturelle Schädigung der Azinuszellen mit defekter Funktion der Zellorganellen führt dazu, dass eine koordinierte Autophagozytose durch die zelleigenen Lysosomen zur Begrenzung des Ausmaßes der Schädigung nicht mehr möglich ist (Gukovskaya & Gukovsky 2012). Anzumerken ist, dass die frühesten molekularen Vorgänge zwischen Cathepsin B und Trypsinogen sowie die damit verbundenen Entstehungstheorien der AP bisher nicht abschließend geklärt sind (Halangk et al. 2000; Sah & Saluja 2011; Weber & Adler 2001).

### 1.1.2 Lokale Aktivierung und Einbeziehung des Immunsystems

Nach Schädigung der Azinuszellen können diese selbst proinflammatorische Zytokine wie z.B. Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in die Umgebung sezernieren (Gukovskaya et al. 1997; Dios 2010). Dadurch können ortsständige Bindegewebszellen, sog. Pankreassternzellen (PSC) aktiviert werden (Masamune et al. 2009), die als Matrixproduzenten für die Entwicklung der Pankreasfibrose bei chronischer Pankreatitis bekannt sind (Apte, Pirola & Wilson 2012). Diese sind in der Lage, nach Stimulation Interleukine (IL-1, IL-8) sowie chemotaktisch wirksame Mediatoren wie z.B. Monocyte Chemoattractant Protein (MCP)-1 und Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES) freizusetzen (Andoh et al. 2000; Masamune et al. 2009). Über diese Signalmoleküle können die PSC wesentlich zur Rekrutierung von Leukozyten aus der Peripherie in das Pankreas beitragen. Gleichzeitig exprimieren Gefäßendothelzellen sowie die Azinuszellen selbst (Frossard et al. 1999) vermehrt das für die Chemotaxis wichtige Molekül Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, welches für Gewebeeinfiltration von Granulozyten und Makrophagen maßgeblich ist (Bhatia 2005; Zaninovic et al. 2000).

Bei der AP wird somit durch schnell reagierende Zellen der unspezifischen Immunabwehr, den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, als Reaktion auf den azinären Schaden eine sterile Inflammation aufgebaut (Weber & Adler 2001; Bhatia 2005). Diese Zellen setzen bei ihrer Aktivierung u.a. potentiell toxische Sauerstoffradikale frei, die ihrerseits gewebeschädigend wirken können (Poch et al. 1999). Durch Interaktion des unspezifischen (neutrophile Granulozyten, Makrophagen) mit dem spezifischen Immunsystem (B- und T-Lymphozyten) kommt es zu einer Unterhaltung der Entzündungsreaktion (Kusske, Rongione & Reber 1996). CD4<sup>+</sup> T<sub>Helfer</sub>-Lymphozyten wird eine Schlüsselrolle an der Regulation der involvierten Makrophagen zugeschrieben, wobei letztere als Effektorzellen das Ausmaß der resultierenden Pankreasläsion bestimmen. Demonstriert wurde dies tierexperimentell anhand einer isolierten Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten während der AP, wodurch sich der Schweregrad der AP signifikant vermindern ließ (Demols et al. 2000). Umgekehrt konnte in unbehandelten Nacktmäusen das Vollbild einer AP allein damit ausgelöst werden, wenn diesen extrahierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus Mäusen mit einer AP transferiert wurden (Demols et al. 2000).

Letztlich resultieren die komplexen intraazinären und inflammatorischen Vorgänge der AP im Zelltod der betroffenen Azinuszellen. Dabei kann dies sowohl in kontrollierter Form der Apoptose wie auch in lytischer Form der Nekrose ablaufen (Bhatia 2004).

Wenngleich die molekularen Mechanismen des Zelltodes in Interaktion mit dem Immunsystem im Detail wenig verstanden sind (Duffield et al. 2000; Brown & Savill 1999; Gregory & Devitt 2004), ist das quantitative Vorkommen dieser beiden Formen des Zelltodes mitverantwortlich für den Schweregrad der AP (Bhatia et al. 1998; Saluja et al. 1996). Eine milde AP weist dabei hauptsächlich azinäre Apoptosen auf, während das Bild einer SAP überwiegend von nekrotischem Zelltod geprägt ist (Bhatia 2004). Für neutrophile Granulozyten konnte gezeigt werden, dass sie über freigesetzte Moleküle die Art des Zelltodes beeinflussen, apoptotische Azinuszellen in die Nekrose überführen und damit die histologische Schädigung verstärken können (Sandoval et al. 1996).

### **1.1.3 Immunologische Dysregulation auf systemischer Ebene**

Wie bereits beschrieben sind für die Gewebeschädigung des Pankreas außer dem unkontrollierten Einwirken der Verdauungsenzyme die nachfolgend rekrutierten neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Lymphozyten verantwortlich (Poch et al. 1999; Pastor et al. 2006). Aufgrund zunehmender immunologischer Erkenntnisse entwickelte sich ein Verständnis dafür, dass die AP durch organüberschreitende Ausweitung der Immunreaktion eine Erkrankung des Gesamtorganismus ist (Kylänpää, Repo & Puolakkainen 2010; Mayerle et al. 2012). Neben der Organaffektion sind diese immunologischen Vorgänge von entscheidender Relevanz für den Krankheitsverlauf (Zhu, Shi & Sun 2003). Ist die lokale Inflammation nicht mehr kontrollierbar und gelangen die ausgeschütteten Zytokine in den Blutkreislauf, wird eine pro-inflammatorische Immunreaktion auf systemischer Ebene (SIRS) angestoßen (Norman et al. 1997; Weber & Adler 2001). Dies ist ein kritischer Punkt für den Schweregrad der AP, insofern der Übergang zum SIRS den Ausgangspunkt für die prognoserelevanten Organkomplikationen darstellt (Bone 1996). Bisher nicht bekannt sind die immunologischen Kontrollmechanismen, die die lokale Inflammation begrenzen können bzw. deren Versagen die Entwicklung einer SAP vorantreibt (Bhatia 2005).

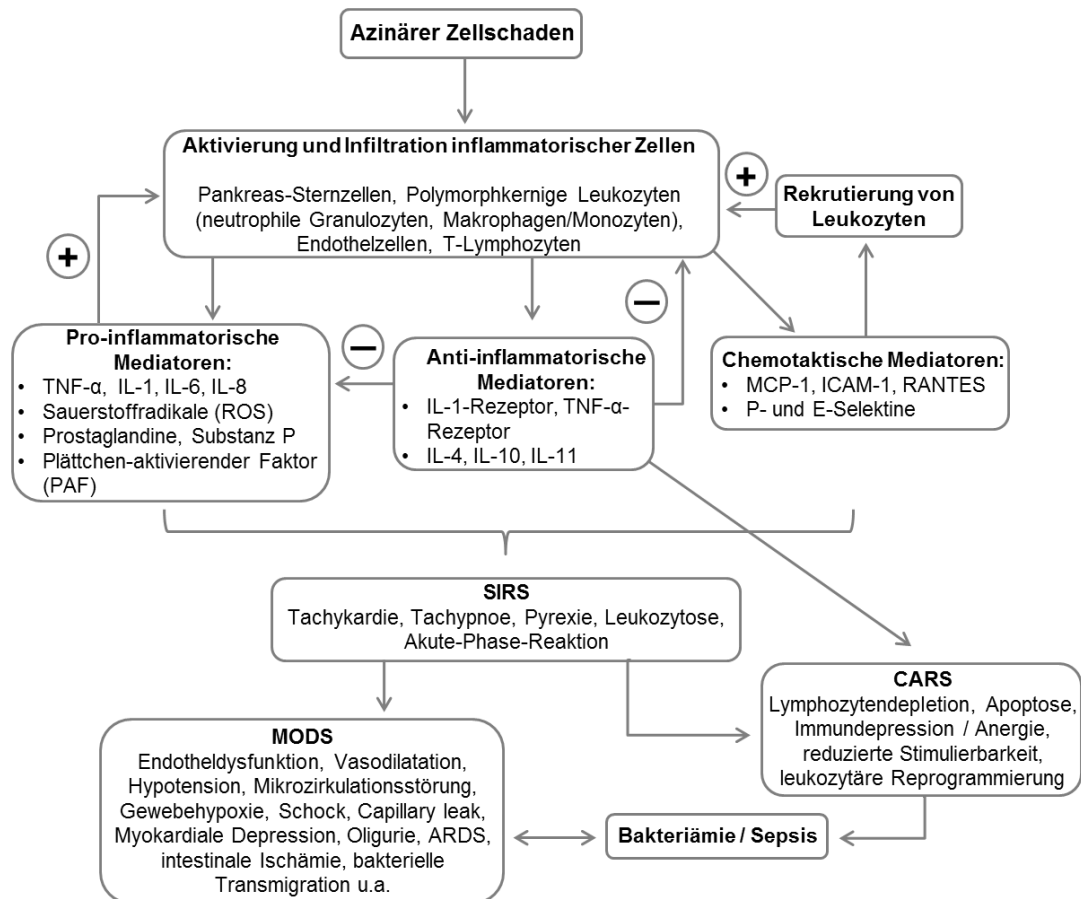
Das SIRS im Generellen, wie auch bei der AP, ist charakterisiert durch Produktion pro-inflammatorischer Moleküle (Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-18, TNF- $\alpha$  u.a.) aus Makrophagen und T-Lymphozyten sowie deren Ausschüttung in die Zirkulation (Bhatia et al. 2000; Malmstrøm et al. 2012). Die vasoaktiven Eigenschaften der Moleküle beeinflussen u.a. den endothelialen NO-Stoffwechsel (Mantovani, Bussolino & Dejana 1992) verschiedener Organe (Lunge, Leber, Darm u.a.), wodurch deren Mikrozirkulation kritisch beeinträchtigt werden kann (Menger, Plusczyk & Vollmar 2001). Die Zytokin-freisetzung ist dabei die Grundlage einer vermehrten kapillären Durchlässigkeit mit konsekutiver Hypoperfusion und Hypoxie, die zu individuellem Organversagen oder bei

Beteiligung mehrerer im Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) resultieren kann (Kylänpää, Rakonczay & O'Reilly 2012; Wilson, Manji & Neoptolemos 1998). Eine häufige Organkomplikation stellt dabei die respiratorische Insuffizienz dar (Halonen et al. 2002; Ranson, Roses & Fink 1973).

Im Rahmen des SIRS werden vom Organismus bereits nach kurzer Zeit physiologischerweise gegenregulatorische Maßnahmen eingeleitet, primär durch Freisetzung antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10, IL-11, Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist u.a. (Kylänpää, Rakonczay & O'Reilly 2012; Goldie et al. 1995). Diese Umkehr von pro- zu antiinflammatorischer Immunitätslage führt schließlich zum sog. kompensatorischen antiinflammatorischen Immunsyndrom (CARS) (Ward, Casserly & Ayala 2008; Bone, Grodzin & Balk 1997). Das Ziel ist dabei die adäquate Beendigung des SIRS und Wiederherstellung der immunologischen Homöostase.

Zur Terminierung der Inflammationsreaktion kann der Organismus die involvierten Makrophagen und Lymphozyten durch genetische Reprogrammierung deaktivieren oder diese durch Zelltodmechanismen eliminieren (Adib-Conquy & Cavaillon 2009; Bone 1996; Mayerle 2009). Aufgrund der Komplexität dieser parallel zu regulierenden, antagonistischen Vorgänge kann dies jedoch leicht zu einem Ungleichgewicht der Immunhomöostase mit Überwiegen der Immunsuppression führen (Bone 1996). Diese immunologische Anergie von Granulozyten und Lymphozyten wurde durch Untersuchungen im Tiermodell sowie an Patienten bestätigt (Mentula et al. 2004; Kylänpää et al. 2005; Shen et al. 2011; Ueda et al. 2002; Curley 1996). Für den Organismus stellt die reduzierte Immunkompetenz ein gesteigertes Risiko für lokale (z.B. infizierte Pankreasnekrosen) und systemische (z.B. Sepsis) bakterielle Infektionen dar (Beger et al. 1986; Stephan et al. 2002).

Einhergehend mit dem zeitlichen Ablauf der zuerst pro- und nachfolgend antiinflammatorischen Immunitätslage sind 2 Mortalitätsgipfel bei der AP beschrieben, einerseits eine Häufung in der Frühphase (nach ca. 1 Woche), andererseits in der Spätphase (nach ca. 3 Wochen) (Bhatia et al. 2000). Für die erhöhte Sterblichkeitsrate in der Frühphase sind Organkomplikationen im Rahmen des durch die AP ausgelösten SIRS verantwortlich (McKay et al. 1999). Der 2. Sterblichkeitsgipfel ist durch eine gesteigerte Empfänglichkeit des Organismus für Infektionen im Stadium der Immunparalyse bedingt (Renner et al. 1985).



**Abbildung 1:** Inflammatorische Vorgänge während der akuten Pankreatitis  
(überarbeitet und angelehnt an: Makhija & Kingsnorth 2002)

#### 1.1.4 Veränderungen im lymphozytären System während der AP

Vollblut als Träger und Teil des Immunsystems mit der Milz als Filterorgan unterliegt verschiedenen Veränderungen während der AP, wovon u.a. Zellen des lymphatischen Systems betroffen sind (Christophi, McDermott & Hughes 1985). In Vollblut-Proben aus Patienten mit AP ließ sich eine Abnahme der zirkulierenden T-Lymphozyten beobachtet (Curley et al. 1993; Pietruczuk et al. 2006). Dies beruht einerseits auf dem Übertritt von Lymphozyten aus dem Blutkreislauf in das entzündete Pankreas durch Chemotaxis (Langer & Chavakis 2009; Demols et al. 2000). Andererseits wurde ein gesteigerter apoptotischer Zelltod von B- und T-Lymphozyten beim Menschen während inflammatorischer Erkrankungen zunächst bei der Sepsis (Hotchkiss et al. 1997; Hotchkiss et al. 2001) und danach auch bei der AP (Takeyama et al. 2000) beobachtet. Bei an Sepsis Verstorbenen konnten vermehrte Apoptosen u.a. in Lymphknoten, Milz und Thymus nachgewiesen werden (Hotchkiss et al. 1999).

Die Lymphozyten unterlaufen einen programmierten Zelltod, der als „activation induced cell death“ (AICD) bezeichnet wird (Green, Droin & Pinkoski 2003). Ausgelöst wird dieser Apoptose-Prozess in T-Lymphozyten durch initialen Kontakt mit Antigen-Strukturen, die u.a. von Bakterien stammen (Unsinger et al. 2006). Für die AP wird die Herkunft der bakteriellen Antigene aus der Darmflora postuliert, wo die beeinträchtigte Mikrozirkulation über eine Barrierestörung der Mukosa den Übertritt von Bakterien ins Blut begünstigen kann (Cicalese et al. 2001). Eine systemische T-Zellaktivierung als Voraussetzung für AICD konnte während der AP bei Patienten anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle bestätigt werden (Sweeney et al. 2003).

Die Apoptose stellt für das Immunsystem ein Instrument zur Kontrolle seiner Homöostase dar (Hildeman et al. 2007). Durch Elimination aktivierter Lymphozyten mittels Apoptose schützt sich der Organismus vor weiterem Schaden durch Limitierung der Inflammation; nachfolgend resultiert aus der zellulären Depletion eine Schwächung des spezifischen Immunsystems, die als Immunsuppression eine gesteigerte Gefahr für opportunistische Infektionen darstellt (Hotchkiss, Tinsley & Karl 2003). Der Verbrauch von Lymphozyten in der Peripherie muss durch deren Rekrutierung und Ausschwemmung aus der Milz in den Blutkreislauf kompensiert werden. Dieser Bedarf zur Unterhaltung der Inflamationsreaktion während der AP kann dabei bis zu einer Verkleinerung der Milz führen, wie im Tiermodell der Ratte demonstriert wurde (Yasuda et al. 2002).

Neben dem zahlenmäßigen Verlust an immunkompetenten Zellen durch Apoptose wird für die Immunparalyse ein weiteres Phänomen verantwortlich gemacht.  $CD4^+$  T<sub>Helfer</sub>-Zellen, die während der AP aus Milzen von Maus und Ratte isoliert wurden, zeigten ein stark vermindertes Ansprechen auf experimentelle Stimulation mit dem Mitogen Concanavalin A, was in einer eingeschränkten Zytokinproduktion *in-vitro* resultierte (Ueda et al. 2002; Curley 1996). Bei Patienten mit AP ließ sich eine funktionelle Anergie auf LPS-Stimulation auch für die aus Vollblut extrahierten Monozyten nachweisen (Kylänpää et al. 2005). Über die Mechanismen dieser funktionellen Veränderungen der T-Lymphozyten wie auch der Monozyten wird spekuliert. Ein supprimierender Einfluss durch lokale oder humoral vermittelte inhibitorische Moleküle wie z.B. IL-10 wird angenommen (Kylänpää et al. 2005). Die genauen Zusammenhänge der immunologischen Anergie, die Rolle der Apoptose und wie sich diese Prozesse auf die Steuerung des Immunsystems und damit den Krankheitsverlauf auswirken, ist nicht geklärt.

## 2 Das Protein p8

Das Gen und sein zugehöriges Protein p8 wurden erstmals 1997 im Pankreas von Ratten während der experimentellen AP beschrieben (Mallo et al. 1997). Während der AP sowie in der folgenden Regenerationsphase zeigte sich im Genexpressionsprofil des Pankreas eine transiente Steigerung von mRNA eines bis dato unbekannten Gens. Über mRNA-, Gensequenz- und Proteinstrukturanalysen konnte schließlich das Gen *p8* mit seinem Transkriptionsprodukt p8 identifiziert werden (Mallo et al. 1997; Vasseur et al. 1999).

Das Gen, welches für das Protein p8 kodiert (Gene ID: 26471; auch: „nuclear protein transcriptional regulator 1“ (NUPR1) oder „candidate of metastasis 1“ (Com-1)) ist im Humangenom auf Chromosom 16 (Position p11.2) lokalisiert und besteht aus 3 Exons und 2 Introns (Iovanna 2002). Es enthält die Basensequenz für ein Protein, das in 2 Isoformen mit einer Länge von 82 bzw. 100 Aminosäuren vorkommen kann (Chowdhury et al. 2009). Namensgebend für das anscheinend nicht-enzymatisch aktive Protein ist sein Molekulargewicht von etwa 8 kDa (8872,7 Da) (Goruppi & Iovanna 2010). Die Aminosäuresequenz weist eine „nuclear localisation sequence“ (NLS) auf, die ein Charakteristikum für im Zellkern lokalisierte Proteine darstellt. Immunhistochemisch wurde die nukleäre Lokalisation von p8 nachgewiesen (Vasseur et al. 1999). Molekularstrukturelle Analysen zeigten ein „helix-loop-helix“-Motiv in der Sekundärstruktur als spezifische Eigenschaft DNA-bindender Proteine (Mallo et al. 1997; Brennan & Matthews 1989), wobei die Bindungsfähigkeit von p8 an die nukleäre DNA bestätigt wurde (Encinar et al. 2001). Zudem besitzt p8 ähnliche biochemische Eigenschaften wie nukleäre Proteine der high-mobility-group-I/Y (HMG-I/Y), die an der Genregulation und -transkription beteiligt sind (Encinar et al. 2001; Hock et al. 2007). Anhand seiner strukturellen Merkmale ließ sich p8 als Transkriptionscofaktor identifizieren, funktionell konnte dies durch eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren (p300, Pax2) bei der Genregulation belegt werden (Hoffmeister et al. 2002).

### 2.1 p8 und die akute Pankreatitis

Außer bei der fetalen Organentwicklung und nach chirurgischer Manipulation ist *p8*-mRNA in gesundem Pankreasgewebe kaum nachzuweisen; in extrapankreatischen Geweben und Organen (Speicheldrüsen, Leber, Niere, Lunge Darm u.a.) ist *p8*-mRNA auch in Abwesenheit einer AP in unterschiedlich hoher Konzentration vorhanden (Mallo et al. 1997). Nach der ursprünglichen Entdeckung während der experimentellen AP ließ sich die Zellstress-abhängige Induktion von *p8 in-vivo* auch in Zellen von z.B. Leber und

Nieren nachweisen (Jiang et al. 1999). Bereits der Mediumwechsel von Zellkulturen genügt zur Induktion von *p8 in-vitro* (Garcia-Montero et al. 2001).

Erste Hinweise auf protektive Eigenschaften von p8 unter inflammatorischen Bedingungen resultierten aus tierexperimentellen Untersuchungen an einer Mauslinie mit gentechnisch generiertem *p8*-knock-out ( $p8^{-/-}$ ). Hierzu wurde  $p8^{-/-}$ -Mäusen Lipopolysaccharid (LPS) injiziert. LPS der Zellwand gramnegativer Bakterien löst u.a. über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) auf Zellen des unspezifischen Immunsystems eine Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und damit ein SIRS aus (Palsson-McDermott & O'Neill 2004). Es zeigte sich eine drastisch höhere Letalität der  $p8^{-/-}$ -Tiere im LPS-Modell verglichen mit der Wildtypkontrolle ( $p8^{+/+}$ ) (Vasseur et al. 2003). Neben höheren TNF- $\alpha$ -Werten im Serum war die Myeloperoxidaseaktivität (MPO) - ein Maß für die Gewebeeinfiltration aktivierter neutrophiler Granulozyten - in Leber und Pankreas der  $p8^{-/-}$ -Tiere signifikant erhöht (Vasseur et al. 2003b). Diese Erkenntnisse wurden als Hinweise auf eine p8-vermittelte protektive Modulation inflammatorischer Prozesse gewertet.

Analog dem LPS-Modell erfolgten Untersuchungen zu p8 und Inflammation anhand einer experimentellen akuten Pankreatitis. Es konnte gezeigt werden, dass in  $p8^{-/-}$ -Mäusen die AP deutlich schwerer verläuft als in  $p8^{+/+}$ -Mäusen, was sich neben serologischem  $\alpha$ -Amylase- und Lipaseanstieg in pankreatischer MPO-Aktivität sowie dem histologischen Bild manifestiert (Vasseur et al. 2003a). Dem Transkriptionscofaktor p8 wird durch seine Induktion bei der AP eine wichtige Rolle an der Stressantwort der exokrinen Pankreaszellen zugeschrieben, sodass sein Fehlen in einer veränderten Anpassungsreaktion resultiert (Vasseur et al. 2003a).

In Folge ätiologisch unterschiedlicher Schädigungen können betroffene Zellen ein genetisches Notfallprogramm aktivieren (Kültz 2005). Dabei wird in der Akutphase das Genexpressionsprofil kurzfristig verändert und einerseits Gene von nicht benötigten Proteinen deaktiviert; andererseits werden Gene von z.B. Hitzeschockproteinen zur zellulären Stabilisierung und Zytoprotektion vermehrt exprimiert (Schlesinger 1990). Ein solches genetisches Rettungsprogramm der Pankreaszellen während der AP ist bekannt (Iovanna et al. 1991). Für die Azinuszellen ist es notwendig, in dieser Anpassungsreaktion eine weitere Synthese seiner eigenen Verdauungsenzyme zu verhindern. Außer p8 werden verschiedene Stressproteine wie Clusterin, Interferon-induzierbares Protein 15 (IP15), Hitzeschockproteine (HSP-60, HSP-70) sowie das Pankreatitis-assoziierte Protein (PAP) induziert (Savkovic et al. 2004). Das zuletzt genannte PAP als Akut-Phase-Protein kommt in 3 Isoformen vor, dessen Sekretion bei Auftreten einer akuten Pankreatitis sowohl beim Mensch (Kemppainen et al. 1996; Motoo et al. 2001)



als auch im Tiermodell (Keim et al. 1994; Graf et al. 2002) stark ansteigt. Die Funktion dieses Proteins war zunächst unklar, während sich schließlich eine antiinflammatorische Wirkung herausstellte (Heller et al. 1999; Vasseur et al. 2003a), u.a. über eine Inhibition von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten (Closa, Motoo & Iovanna 2007). Die Induktion von PAP-I ist von p8 abhängig, sodass eine p8-Defizienz folglich zu einem Mangel an PAP-I führt, was als eine der lokalen Ursachen für den schwereren Verlauf aufgeführt wurde (Vasseur et al. 2003a).

Außer der Regulation der Expression von Akut-Phase-Proteinen wird spekuliert, dass p8 während der Inflammation (LPS-Stress, AP) die Rekrutierung und Extravasation v.a. der neutrophilen Granulozyten in beteiligten Organen beeinflusst (Vasseur 2003; Vasseur et al. 2003). Bislang nicht geklärt ist, ob dies durch die Expression von p8 in den migrierenden Leukozyten, dem Zielgewebe oder in beiden vermittelt wird.

## **2.2 Der Einfluss von p8 auf apoptotische Prozesse**

Über Funktionen und Einfluss von p8 wurden in den letzten 10 Jahren zahlreiche Erkenntnisse gewonnen, die Bereiche von Inflammation, Tumorentwicklung und Metastasierung über Zellzyklusregulation und Apoptose bis hin zu diabetischer Nephropathie und Herzinsuffizienz umfassen (Ito et al. 2005b; Pärth et al. 2004; Goruppi et al. 2007; Goruppi, Bonventre & Kyriakis 2002; Jiang, Davies & Fodstad 2005; Jiang et al. 2006; Vasseur et al. 2003b; Vasseur et al. 2003a; Kong et al. 2010).

Neben der protektiven Wirkung von p8 auf den Verlauf der experimentellen AP sowie des LPS-Modells sind der Einfluss auf Zellwachstum und -zyklus aus *in-vitro* Untersuchungen bekannt (Vasseur et al. 2002a). Aufgrund dieser Eigenschaften richtete sich der Fokus auf einen möglichen Zusammenhang mit Tumorentwicklung und Tumorentstehung (Vasseur et al. 2002b). Eine andere Arbeitsgruppe identifizierte im Jahr 2000 bei Untersuchungen an malignen Brustkrebszellen weiblicher Patienten ein darin vermehrt exprimiertes Protein, welches als „candidate of metastasis 1“ (Com-1) bezeichnet wurde (Ree et al. 2000). Der Abgleich der Gensequenz erbrachte, dass es sich bei p8 und Com-1 um dasselbe Gen bzw. Genprodukt handelt (Vasseur et al. 1999).

Apoptose als Form des kontrollierten Zelltodes ist u.a. ein zentrales Geschehen in der Tumorentwicklung und stellt ein komplex reguliertes Zusammenspiel vieler intrazellulärer Signal- und Effektormoleküle dar (Evan & Vousden 2001). Im Kontext der Malignomforschung konnte eine Beteiligung von p8 an apoptotischen Prozessen gefunden werden (Carracedo et al. 2006). Trotz zunehmender Erkenntnisse ist eine einheitliche Aussage zur Funktion von p8/Com-1 bezüglich der Apoptose nicht möglich,

da es von der Tumorentität und gewebespezifischen Faktoren abhängig zu sein scheint (Carracedo et al. 2006). Dabei fanden sich in verschiedenen untersuchten Geweben wie Mamma-, Pankreas-, Prostata- und Schilddrüsenkarzinomen unterschiedliche Korrelationen von *p8*-Expression zu Apoptoseverhalten und Invasivität des Malignoms (Ito et al. 2005b; Ree et al. 2000; Su et al. 2001; Goruppi & Iovanna 2010). Beispielhaft sei einerseits das tumorsupprimierende Verhalten von *p8/Com-1* auf Prostatakarzinomzellen und Brustkrebszellen genannt (Jiang et al. 2006; Jiang, Davies & Fodstad 2005; Ito et al. 2005a). Andererseits fanden sich tumorwachstumsfördernde Eigenschaften von *p8* in murinen Embryofibroblasten (Vasseur et al. 2002a) sowie im medullären Schilddrüsenkarzinom (Ito et al. 2005b). Detaillierte molekulare Erklärungen zum Einfluss von *p8* auf Apoptose im Rahmen der Tumorbilogie fehlen bisher. Ein möglicher Zusammenhang zwischen *p8* und den beschriebenen apoptotischen Vorgängen bei akut-inflammatorischen Krankheitsbildern wurden ebenfalls nicht veröffentlicht.

### **3 Zielstellung der Arbeit**

Die akute Pankreatitis ist eine entzündliche Erkrankung der Bauchspeicheldrüse, auf die eine systemische Inflammationsreaktion folgt, deren Pathophysiologie unvollständig verstanden bleibt (Waldthaler, Schütte & Malfertheiner 2010; Bhatia et al. 2005). Für den Verlauf und Schweregrad der AP ist neben der lokalen Organschädigung die immunologische Dysregulation maßgeblich von prognostischer Bedeutung (Mayerle 2009). Aus tierexperimentellen Studien *p8*-defizienter Mäuse ist bekannt, dass das Protein *p8* den Verlauf inflammatorischer Krankheitsbilder wie dem LPS-Modell und die akute Pankreatitis positiv beeinflusst und zytoprotektiv wirkt (Vasseur et al. 2003b; Vasseur et al. 2003a). Die bisher veröffentlichten Arbeiten zur AP im *p8*<sup>-/-</sup>-Tiermodell konzentrierten sich auf die lokalen Vorgänge im Pankreas, wobei *p8* als Transkriptionscofaktor eine wichtige Rolle an der Genregulation der zellulären Stressantwort zugeschrieben wird (Vasseur et al. 2003b). Daten bzw. immunologische Arbeiten zum Einfluss von *p8* auf das Immunsystem liegen nicht vor.

Berücksichtigt man die Vorkenntnisse zum AP-Verlauf bei *p8*-Deletion sowie die Bedeutung der ausgelösten systemischen Inflammationsreaktion, kann ein Zusammenhang zwischen *p8* und der Funktion des Immunsystems vermutet werden.

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass *p8* immunmodulierende Eigenschaften hat und während der akuten Pankreatitis auch auf systemischer Ebene die Inflammationsreaktion und damit die AP direkt beeinflusst. Dieser Einfluss führt zu

spezifischen phänotypischen Veränderungen der an der Immunantwort beteiligten myeloiden sowie lymphatischen Zellen und Organe.

Ziel der Arbeit war es, anhand des Tiermodells der Caerulein-induzierten akuten Pankreatitis einen Zusammenhang zwischen Protein p8 und den zellulären Komponenten des unspezifischen und adaptiven Immunsystems zu untersuchen und darüber Erkenntnisse über seine Rolle während der akuten Pankreatitis zu erlangen. Alle *in-vivo* Versuche wurden im Tiermodell einer etablierten Mauslinie mit gentechnisch inaktiviertem p8-Gen ( $p8^{-/-}$ , C57BL6-Hintergrund) durchgeführt, die mit einer Wildtyp-Linie (C57BL6/J;  $p8^{+/+}$ ) verglichen wurden.

Der erste Teil der Arbeit sollte prüfen, ob der gentechnisch erzeugte Verlust des p8-Gens per se einen immunologischen Nachteil darstellt und zu morphologischen Veränderungen führt. Dass das Fehlen eines einzelnen Proteins ausreicht, um den histologischen Aufbau immunologischer Organe wie Milz und Lymphknoten und nachfolgend dadurch deren Immunfunktion zu beeinträchtigen, konnte in Mäusen mit Defekt des für das Stressprotein Hämoxxygenase-1 kodierenden *Hmox-1*-Gens gezeigt werden (Kapturczak et al. 2004). Für das Modell der  $p8^{-/-}$ -Maus sollte dies mit einer deskriptiven Charakterisierung des Immunsystems unter unstimulierten Bedingungen beantwortet werden, sowohl in einer Gruppe 10-12 Wochen junger Tiere, als auch während der Immunseneszenz (20-24 Wochen) zur Erfassung altersbedingter Veränderungen des Immunsystems. Der Schwerpunkt lag außer bei den parenchymatösen Organen Pankreas, Lunge und Leber auf den lymphatischen Geweben Thymus, Milz, und Lymphknoten. Die Mikroarchitektur der verschiedenen Gewebearten wurde mittels histologischer Übersichts- (HE) und Spezialfärbungen (Elastika-van-Gieson, Resorcin-Fuchsin, Berliner Blau) aufgearbeitet und lichtmikroskopisch untersucht, ergänzt um immunhistochemische Methoden (B- und T-Lymphozyten, myeloide Zellen).

Zur Differentialzytologie der Lymphozyten und myeloiden Zellen aus Vollblut und Milz wurde die Durchflusszytometrie (FACS) verwendet. Maschinelle laborchemische Vollblutanalysen (Eisenstatus, Enzymaktivitäten) ergänzten das Spektrum. Die Phänotypisierung der Organe sollte hierbei auch als Grundlage für die nachfolgenden Untersuchungen zur Immunpathologie während der akuten Pankreatitis dienen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden analoge Immunphänotypisierungen im Krankheitsmodell der akuten experimentellen Pankreatitis durchgeführt. Die AP wurde durch 7, jeweils stündliche intraperitoneale Caerulein-Injektionen ausgelöst. Neben den Untersuchungen in der Akutphase der Erkrankung (1 Stunde nach Beendigung der

Injektionen) wurden diese 96 Stunden nach der Induktion zur Erfassung der Immunrekonstitution wiederholt. Im Fokus standen mögliche Unterschiede innerhalb des Immunsystems unter Stressbedingungen und während der Rekonvaleszenz, die im Zusammenhang mit dem beschriebenen schwereren Verlauf der AP in der  $p8^{-/-}$ -Mauslinie stehen könnten.

Neben den bereits erläuterten Methoden zur Immunphäotypisierung erfolgte während der AP eine Visualisierung des Apoptoseverhaltens von Milzlymphozyten mittels TUNEL-Methode. Aus den Vollblut- und Blutplasma-proben wurden die Aktivitäten unterschiedlicher Enzyme (Lipase,  $\alpha$ -Amylase u.a.) zur Verlaufsbeurteilung der AP untersucht. Das Ausmaß der Inflammation wurde über die durchflusszytometrische Konzentrationsbestimmung verschiedener Zytokine (IL-2, IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ ) erfasst.

Nach Auswertung der Ergebnisse sollte der immunologische Einfluss von p8 und die mögliche Bedeutung für den Krankheitsverlauf der AP diskutiert werden. Weitere Aspekte waren molekulare Zusammenhänge zwischen p8 und den inflammatorischen Vorgängen sowie weiterführende Untersuchungen.

## 4 Publikation

Titel:	<i>p8</i> Deficiency Causes Siderosis in Spleens and Lymphocyte Apoptosis in Acute Pancreatitis
Autoren:	Weis, S.*, Schlaich, T.C.*, Dehghani, F., Carvalho, T., Sommerer, I., Fricke, S., Kahlenberg, F., Mössner, J. und Hoffmeister, A.; * geteilte Erstautorschaft
Zeitschrift:	Pancreas, Journal of neuroendocrine tumors and pancreatic diseases and sciences, Jg. 43, H. 8, S. 1277-1285
Publikationsdatum:	November 2014
DOI:	10.1097/MPA.0000000000000172
ISSN:	0885-3177
Pubmed-ID:	25098696
Literaturangaben:	43
Sprache:	Englisch
Impact Factor:	3,008
Begutachtung:	peer-reviewed

## ORIGINAL ARTICLE

# *p8* Deficiency Causes Siderosis in Spleens and Lymphocyte Apoptosis in Acute Pancreatitis

Sebastian Weis, MD,\* Tilmann Cornelius Schlaich, MD,\* Faramarz Dehghani, MD,†‡ Tânia Carvalho, PhD,§ Ines Sommerer,\* Stephan Fricke, MD,||¶\*\* Franka Kahlenberg, MD,¶ Joachim Mössner, MD,\* and Albrecht Hoffmeister, MD\*

**Objectives:** The gene *p8* was initially described in pancreatic tissue during acute experimental pancreatitis, a disease that is characterized by a systemic immune response. Although early reports suggested that *p8* affects leukocyte migration during acute pancreatitis (AP), no studies revealing its immune-modulatory effects have been performed.

**Methods:** We investigated the composition of the cellular immune system in naive *p8* knockout (*p8*<sup>-/-</sup>) mice and compared with matched wild-type mice during pancreatitis.

**Results:** In young mice, there were no relevant differences in the composition of peripheral and splenic CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>, and Gr-1<sup>+</sup> cells. In mature *p8*<sup>-/-</sup> mice, increased splenic CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> cells, spleen siderosis, and increased marginal zones in the splenic white pulp were found. During AP, peripheral and splenic CD3<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> declined stronger in the *p8*<sup>-/-</sup> mice. The spleen of the *p8*<sup>-/-</sup> mice showed severe hypoplasia of the white pulp and mild hyperplasia of the red pulp. This was associated with a significantly increased rate of apoptosis.

**Conclusions:** We conclude that *p8* has no impact on the cellular composition of the adaptive and innate immune systems in noninflammatory conditions. However, it may limit apoptosis and maintain homeostasis of the immune reaction during AP.

**Key Words:** *p8*, pancreatitis, spleen, apoptosis, lymphocyte, siderosis

**Abbreviations:** AICD - activation-induced cell death, AP - acute pancreatitis, APC - allophycocyanin, FITC - fluorescein isothiocyanate, HE - hematoxylin and eosin, PBS - phosphate-buffered saline, PE - phycoerythrin, PerCP - peridinin chlorophyll protein, ROS - reactive oxygen species, T<sub>reg</sub> - regulatory T cell

(*Pancreas* 2014;43: 1277–1285)

From the \*Division of Gastroenterology and Rheumatology, Department of Internal Medicine, Neurology, and Dermatology, Universitätsklinikum Leipzig AöR, Leipzig; †Institute of Anatomy, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg AöR, Halle/Saale; ‡Institute of Anatomy, Universität Leipzig, Leipzig, Germany; §Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal; ||Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology; ¶Institute of Clinical Immunology, Universitätsklinikum Leipzig; #Translational Center for Regenerative Medicine, Universität Leipzig; and \*\*Division of Hematology and Oncology, Department of Internal Medicine, Neurology, and Dermatology, Universitätsklinikum Leipzig AöR, Leipzig, Germany.

Received for publication August 22, 2013; accepted April 7, 2014.

Reprints: Sebastian Weis, MD, Department of Internal Medicine, Neurology, and Dermatology, Universitätsklinikum Leipzig AöR, Liebigstraße 20 04103 Leipzig, Germany (e-mail: sebastian.weis@medizin.uni-leipzig.de; sebweis@hotmail.com).

The authors declare no conflict of interest.

All experiments were performed in the University Hospital Leipzig, Germany. The histologic evaluation was done by Dr Carvalho at the Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal. Author Sebastian Weis is now at the same institute as a postdoctoral fellow.

Authors Sebastian Weis and Tilmann Cornelius Schlaich contributed equally in this article.

Supplemental digital contents are available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.pancreasjournal.com).

Copyright © 2014 by Lippincott Williams & Wilkins

Acute pancreatitis (AP) is a potentially fatal disease whose initiating events and prognostic factors are barely understood.<sup>1</sup> Despite advances in the supportive treatment, mortality can still reach 30% in severe cases with multiorgan failure.<sup>2</sup> It is now widely accepted that, aside from the paradigm of self-digestion of the pancreas and local pathologies, the course of the disease is determined by a systemic inflammatory response syndrome, posing the organism at risk for multiorgan failure.<sup>1,3,4</sup> Because of the compensatory anti-inflammatory response syndrome, patients are at risk for immunosuppression and predisposed to infection.<sup>5</sup> The spleen has been shown to be importantly involved in the course of AP because the function of spleen lymphocytes is severely impaired during AP and because spleen lymphocytes replenish apoptotic lymphocytes in the circulation.<sup>6–8</sup> In contrast, apoptosis in the spleen usually does not occur and has only been reported in a severe disease model in rats using retrograde taurocholate infusion.<sup>9</sup> The factors that are responsible for the complex interplay of immune components during AP and that promote the initial local inflammation to become systemic are unknown.<sup>3</sup> Thus, a better understanding of the immunologic changes in AP may be crucial to develop better diagnostic, prognostic, and therapeutic tools.

The anti-inflammatory properties of the cotranscription factor *p8* have first been described in pancreatic tissue during AP.<sup>10</sup> Disruption of the *p8* gene (*p8*<sup>-/-</sup>) leads to a more severe disease in a murine model of cerulein-induced experimental pancreatitis.<sup>11</sup> Moreover, survival of the *p8*<sup>-/-</sup> mice was lower after lipopolysaccharide injection as compared with the control mice, indicating a deficiency in the protection or impairment of the immune response under stressful conditions.<sup>12</sup> Although most of the work on *p8* has concentrated on the alterations in pancreatic parenchyma during inflammation and cancer,<sup>11–15</sup> the influence of the gene on the systemic immune response during AP has not been studied so far. This seems surprising because *p8* messenger RNA is found in immune organs such as thymus and spleen<sup>16</sup> and lipopolysaccharide injection-induced *p8* messenger RNA in rodent lymphoid tissues (own unpublished data). Moreover, in former studies, it has been suggested that *p8* influences leukocyte migration.<sup>12</sup>

The purpose of our study was to investigate the influence of *p8* on the composition of the cellular immune system in young (10–12 weeks) and mature (20–24 weeks) mice, taking into account the impact of senescence on the function of the unmanipulated immune system,<sup>17,18</sup> as well as the course of edematous, nonlethal AP using the murine model of cerulein-induced pancreatitis.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

All mice were housed and treated in accordance with the guidelines of the University of Leipzig Animal Care Committee. Homozygous *p8* knockout (*p8*<sup>-/-</sup>) mice with a C57BL/6 background carrying targeted disruption of the *p8* gene were kindly



provided by Juan L. Iovanna (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Marseille, France). Engineering of the genetic deletion has been described previously.<sup>19</sup> The mice were kept under nonsterile conditions with an underlying 12-hour day/night rhythm and fed with standard rodent chow and water. Histomorphological assessments and measurements of lymphocytes and myeloid cells were performed both in young (10–12 weeks) and mature (20–24 weeks) mice. Acute pancreatitis was induced in young mice only. The control mice were age- and sex-matched wild-type ( $p8^{+/+}$ ) C57BL/6 mice. The study was performed in accordance with the European Union regulation for animal experiments and approved by the local appointee for animal welfare (animal experiment registration number, TVV 36/10).

### Induction of Acute Experimental Pancreatitis

The mice were fasted 14 hours with free access to water. Acute pancreatitis was induced by 7 hourly intraperitoneal injections of cerulein (50  $\mu$ g/kg body weight; Sigma). During the phase of induction, access to food was denied. The mice were killed free of pain in accordance with the guidelines of the University of Leipzig Animal Care Committee 1 hour after the last injection (indicated as 1 hour) and after 96 hours (indicated as 96 hours). The control mice received 7 intraperitoneal injections of 0.9% sterile saline (100  $\mu$ L/10 g body weight). The control group was killed 1 hour after the last dose.

### Assessment of AP

Onset of AP was monitored by determining plasma activity of  $\alpha$ -amylase and lipase. Alkaline phosphatase,  $\gamma$ -glutamyltransferase, alanine transaminase, aspartate transaminase, glucose, and bilirubin served to assess the possible complications during pancreatitis. Severity of AP was scored by a pathologist (T.C.) who was blinded to the experimental groups. Histologic lesions such as edema, inflammation, vacuolization, and necrosis were scored, as previously described by Rongione et al<sup>20</sup> and resumed in Supplemental Digital Content Table 1, <http://links.lww.com/MPA/A324>.

### Whole Blood and Plasma

Whole blood was obtained by retro-orbital bleeding under anesthesia and was used for hematological and flow cytometric analyses. Hematological and plasmatic analyses were performed in mice-adjusted instrument settings (Institute of Laboratory Medicine, Universitätsklinik Leipzig). Plasma was extracted from heparinized whole blood after centrifugating twice (1.400  $\times$  g for 10 minutes and 11.200  $\times$  g for 5 minutes). One aliquot was immediately frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for measuring cytokines. The cytokines were measured with the cytometric bead array (Flex Sets interleukin [IL]-2, Becton, Dickinson and Company (BD) #558297; IL-6, BD #558301; IL-10, BD #558300; and interferon gamma BD, #558296) in accordance with the manufacturer's protocols.

### Histology

The mice were anesthetized and killed by cervical dislocation. The organs (pancreas, spleen, mesenteric lymph nodes, liver, thymus, and lung) were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin wax. The paraffin sections measuring 5  $\mu$ m were stained with hematoxylin and eosin (HE) using a full-automatic microscope slide appliance (Shandon Varistain 24-4; Thermo Shandon Ltd).

Further histochemical analysis was performed to assess iron deposition (Prussian blue staining), reticular fibers' distribution (Gomori silver staining), collagen, and elastin (van Gieson stain and Weigert resorcin-fuchsin, respectively). Briefly, for Prussian blue staining, hydrochloric acid and potassium ferricyanide were

used (Fluka), counterstained with nuclear fast red (Carl Roth). For Gomori silver staining method, slides were pretreated with potassium permanganate (0.5%/2 minutes) and potassium metabisulfite (2%/1 minute; Riedel-de Haën) and was sensitized with iron-alum (2%/1 minute; Carl Roth). The tissue was then incubated with ammoniacal silver solution (1 minute; Carl Roth), followed by formalin (4%/5 minutes) and gold chloride (30 seconds; Carl Roth) and finally fixed in sodium thiosulfate (1%/1 minute; Carl Roth). Counterstaining was performed with nuclear fast red. For connective tissue staining, the slides were incubated with resorcin-fuchsin solution (10 minutes; Carl Roth), rinsed, and then transferred to van Gieson picrofuchsin (15 minutes; Carl Roth). Counterstaining was performed with Weigert iron-hematoxylin (2 minutes; Carl Roth). Measurement of follicle diameters was done using the ImageJ software in 7 to 9 completely seen follicles in young and mature  $p8^{-/-}$  and matched control mice. Megakaryocytes were counted by light microscopy (original magnification  $\times 200$ ) evaluating 5 visual fields.

### Multicolor Flow Cytometry

Heparinized whole blood aliquots of 50  $\mu$ L were diluted each with 50  $\mu$ L of phosphate-buffered saline (PBS). Unspecific binding was blocked using 500 ng of anti-CD16/32 (Fc Block, #553141; BD Pharmingen). After incubation with the antibodies for 20 minutes at  $4^{\circ}\text{C}$  (CD3, CD4, CD8, CD11b, and Gr-1, see later for details), the erythrocytes were lysed. The samples were washed twice in ice-cold PBS with alternate centrifugation (280 g/8 minutes,  $8^{\circ}\text{C}$ ) and were finally fixed in paraformaldehyde/PBS (1%). After cutting, the spleens were squeezed using 70- $\mu$ m cell strainers and rinsed with PBS. Cell suspensions were centrifuged (400 g for 10 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ) and pellets were resuspended twice with ammonium-chloride-potassium lysis buffer for 2 minutes at room temperature. Leukocytes were counted (CASY Technology Cell Counter; Schärfe System) and aliquots of  $2 \times 10^6$  cells/100  $\mu$ L per tube were prepared for Fc receptor blocking (Fc Block, 250 ng/ $2 \times 10^6$  cells, 10 minutes,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Directly coupled fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled, phycoerythrin (PE)-labeled, peridinin chlorophyll protein (PerCP)-labeled, and allophycocyanin (APC)-labeled monoclonal antibodies against CD3e (PerCP, #553067), CD4 (FITC, #557307), CD8a (PE, #553032), CD45R/B220 (APC, #553092), CD45 (PerCP, #557235), CD11b (APC, #553312; FITC, #557396; all from BD Pharmingen), and Gr-1 (PE, #CL8991PE-3; Cedarlane) in accordance with the manufacturer's instructions were incubated with the cell suspension on ice for 30 minutes. Optimal antibody concentrations were between 150 and 250 ng of antibody per  $2 \times 10^6$  cells. After washing twice in ice-cold PBS and centrifugation, the pellets were resuspended and fixed with 300  $\mu$ L of fixation buffer (paraformaldehyde/PBS, 1%). Isotype controls were corresponding IgG1, IgG2a, and IgG2b (all from BD Pharmingen). The samples were measured using a BD LSR II (Becton Dickinson), realized by the Fluorescence Core Unit of the Interdisciplinary Center for Clinical Research, Universität Leipzig. The data were analyzed using the FACSDiva software (version 6.1.3. BD). Neutrophils in the blood were GR-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> cells after gating using the forward and sideward scatter. Spleen neutrophils were identified as GR-1<sup>+</sup>CD11b<sup>low/high</sup>, macrophages as GR-1-CD11b<sup>+</sup> and regulatory T cells ( $T_{\text{regs}}$ ) as CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> as previously described.<sup>21,22</sup>

### Immunohistochemistry

For immunohistochemistry, the 5- $\mu$ m sections were deparaffinized. Antigen retrieval, which is necessary for T-lymphocyte staining, was performed by boiling the samples in 0.1 M of citrate

buffer in a microwave for 5 minutes followed by blocking of endogenous peroxidases (1.5 mL of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [30%] in 100 mL of methanol). The slides were washed in PBS/Triton (3 × 10 minutes) and incubated with normal goat serum (dilution 1:20, #005-000-121; Jackson) for 30 minutes. The primary antibodies (CD3 1:50, #MCA1477, AbD Serotec; CD11b 1:100, #MCA74G, AbD Serotec; CD45R/B220 1:500, #550286, BD Pharmingen) were diluted in 0.5% bovine serum albumin (in PBS/Triton) and

incubated overnight at 4°C. Previously optimal dilutions were tested stepwise in dilution series from 1:10 to 1:1,000. After washing with PBS/Triton, the secondary antibody (biotinylated goat antirat IgG 1:100, #BA-9400, Vector; goat antirabbit 1:100, #B7389, Sigma) was added for 1 hour at room temperature. After washing, the slides were incubated with peroxidase-linked avidin (ExtrAvidin-Peroxidase 1:100 in PBS/Triton; Sigma) for 60 minutes and stained with 3,3'-diaminobenzidine (0.05 g

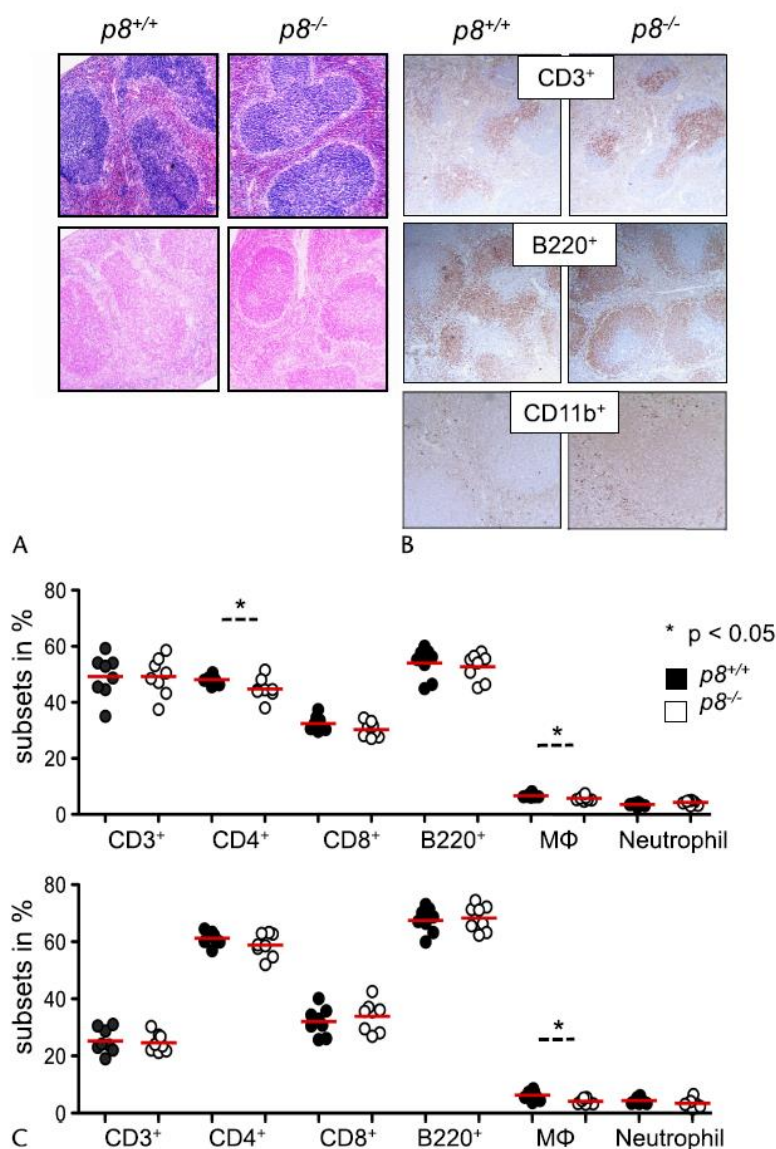


FIGURE 1. A, Representative HE and Prussian blue staining from young  $p8^{-/-}$  and control mice showing no difference in the morphology between the 2 animal strains and no splenic siderosis. B, Immunohistochemistry displays regular arrangement of CD3<sup>+</sup> T cells in the follicle center and B220<sup>+</sup> B cells in the follicle cortex. CD11b<sup>+</sup> cells were located mainly in the perifollicular strains of the red pulp (original magnification ×50, scale bar 100 μm). C, Flow cytometric analysis of splenocytes (upper panel) as well as peripheral lymphocytes and myeloid cells (lower panel) from young  $p8^{-/-}$  and control mice showing no relevant difference between animal strains. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells are presented as subsets of CD3<sup>+</sup> cells. Each dot represents 1 individual mouse. Data pooled from 3 to 5 independent experiments. Red lines indicate the average. **Editor's note:** A color image accompanies the online version of this article.



of 3,3'-diaminobenzidine in 100 mL of Tris and 50  $\mu$ L of  $H_2O_2$ ). Counterstaining was done with Mayer hemalaun (#A0884; AppliChem). Photographs were captured with a Moticam 2500 mounted on a Zeiss AxioLab.

### TUNEL Staining

For terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) staining, the 5- $\mu$ m sections were deparaffinized and incubated for 15 minutes in Proteinase K (QIAGEN); after washing with PBS, the slides were incubated with TUNEL reaction mixture for 1 hour at 37°C (In Situ Cell Death Detection Kit; Roche Diagnostics) and the nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (#6335.1; Carl Roth). Pictures were captured on a confocal microscope (Zeiss LSM 510 META). The slides of 3 different animals and 5 blinded visual fields were analyzed. Apoptotic nuclei were counted in 5 high-power fields per animal.

### Statistical Analysis

Statistical testing was performed with Statistical Package for the Social Sciences (version 18.0) using the nonparametric Mann-Whitney *U* test for 2 independent groups and the Student *t* test. Statistical significance was considered if  $P < 0.05$  and given when appropriate. The results are presented as mean value  $\pm$  standard deviation.

## RESULTS

### *p8* Does Not Relevantly Influence the Composition of Lymphocytes and Myeloid Cells in Young Mice

In our study, we aimed to investigate the influence of *p8* on the composition of the cellular immune system. In the first step, we studied the phenotype of young (10–12 weeks) *p8*<sup>+/+</sup> mice focusing mainly on lymphocytes and myeloid cells both through histologic examination of primary and secondary immunologic organs and through flow cytometric analysis of the spleen and the peripheral blood (Fig. 1A; Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/MPA/A326>). As previously reported, the *p8*<sup>+/+</sup> mice did not show differences in reproduction, fertility, as well as somatic and neurological development or behavior.<sup>11</sup> The result of the histologic examination of thymus, mesenteric lymph nodes, pancreas, liver, lungs, and intestines was unremarkable. The result of the immunohistochemistry of spleen, thymus, and lymph nodes investigating B-(B-220<sup>+</sup>), T lymphocytes (CD3<sup>+</sup>), and monocytes/macrophages (CD11b<sup>+</sup>) revealed no differences in the arrangement of these subsets in lymphatic tissues between animal strains (Fig. 1B). Splenic follicles showed a clear T-cell-rich center enclosed by a B-cell zone. The CD11b<sup>+</sup> cells were ascribed to the marginal zone and the red pulp (Fig. 1B). The flow cytometric analysis showed that the young *p8*<sup>+/+</sup> mice had statistically significant less CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-helper cells in spleens (*p8*<sup>+/+</sup>, 44.8 vs *p8*<sup>+/+</sup>, 48.1%;  $P = 0.038$ ) and significantly decreased amounts of monocytes/macrophages (CD11b<sup>+</sup>Gr-1<sup>+</sup>) in spleens (*p8*<sup>+/+</sup>, 5.8 vs *p8*<sup>+/+</sup>, 6.7%;  $P = 0.028$ ) and in whole blood (*p8*<sup>+/+</sup>, 4.1% vs *p8*<sup>+/+</sup>, 6.3%;  $P = 0.007$ ). However, overall differences were rather small. There were no significant differences in the percentage of CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells, T<sub>reg</sub>, B220<sup>+</sup> cells, and neutrophils in the *p8*<sup>+/+</sup> mice as compared with the mature matched control mice (Fig. 1C). Differential blood cell counts were equal between animal strains and showed no signs of a leukocytosis, leukopenia, or anemia (Table 1). Nevertheless, automated differential blood cell count was remarkable for a decreased total number of neutrophils in the *p8*<sup>+/+</sup> mice (*p8*<sup>+/+</sup>, 0.1 vs *p8*<sup>+/+</sup>,

**TABLE 1.** Differential Blood Cell Count of the Young *p8*<sup>+/+</sup> and Control Mice; Mean (SD)

	<i>p8</i> <sup>+/+</sup>	<i>p8</i> <sup>+/+</sup>	<i>P</i>
Hb, g/dL	15.9 (0.8)	16.2 (0.5)	n.s.
Thrombocytes, 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	608 (340)	757 (164)	n.s.
Leukocytes, 10 <sup>3</sup> / $\mu$ L	4 (2.4)	5.1 (1.1)	n.s.
Lymphocytes, %	92.5 (4.8)	87.7 (5.7)	n.s.
Monocytes, %	1.1 (1.2)	1.1 (1.1)	n.s.
Neutrophils, %	0.5 (0.2)	0.1 (0.1)	0.03
Eosinophils, %	0.2 (0.2)	0.4 (0.3)	n.s.
Basophils, %	5.7 (3.5)	10.7 (4.8)	n.s.

None of the examined parameters indicated an anemia or leukocytosis. However, there was a decrease of neutrophil granulocytes in the *p8*<sup>+/+</sup> mice ( $n = 6$  per group).

n.s. indicates nonsignificant; Hb, hemoglobin.

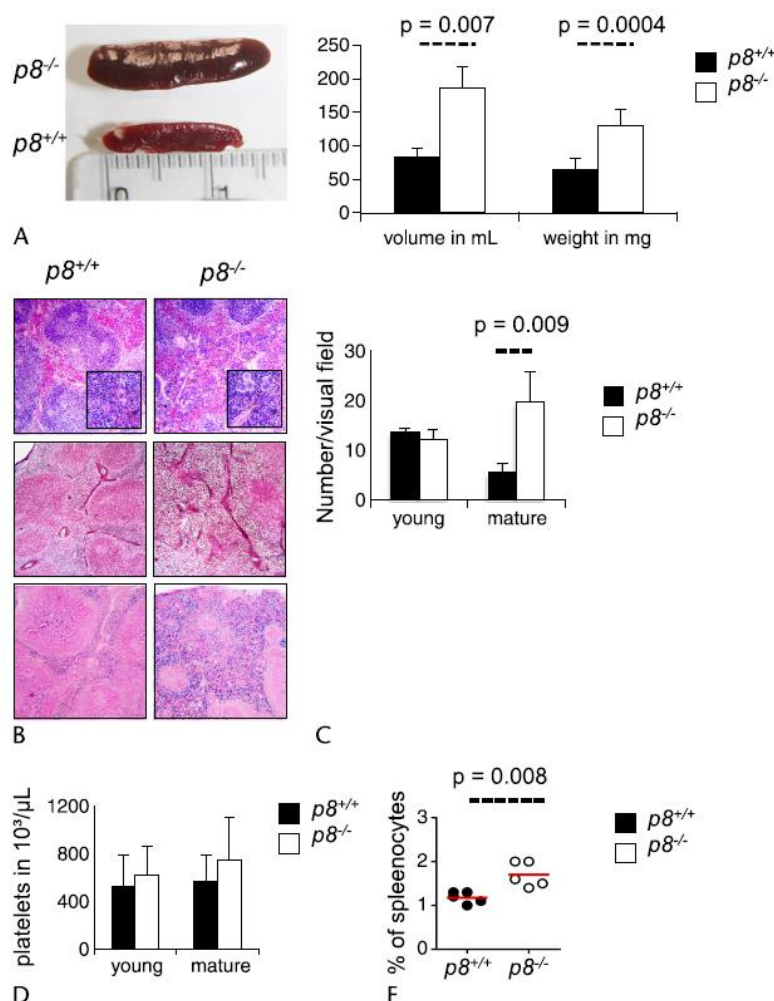
0.5;  $P = 0.03$ ; Table 1). However, the flow cytometric analysis of the percentage of neutrophils did not show any differences ( $P = 0.15$ ).

### *p8* Deficiency Causes Splenomegaly and Splenic Siderosis in Mature Mice

Next, we wondered whether *p8* influences the lymphocyte subsets in mature mice. Therefore, the composition of the immune system in mature (20–24 week old) *p8*<sup>+/+</sup> mice and control mice of the same age were compared. Interestingly, the mature mice develop a marked splenomegaly ( $P = 0.007$ ; Fig. 2A) with an increased density of marginal zone siderophages (Fig. 2B) and a statistically significant increased area of the marginal zone of the *p8*<sup>+/+</sup> mice ( $P = 0.035$ ; Supplemental Digital Content 2C, <http://links.lww.com/MPA/A326>). The total follicle size was not different between mouse strains (Supplemental Digital Content 2D, <http://links.lww.com/MPA/A326>). The HE staining of the spleens from the mature *p8*<sup>+/+</sup> mice revealed areas of disturbed microarchitecture with removed white-red pulp boundaries (Fig. 2B). There were no signs of liver or splenic fibrosis (Fig. 2B; Supplemental Digital Content 2B, <http://links.lww.com/MPA/A326>). Siderosis was not observed in other organs such as liver and pancreas or in control mice (Fig. 2B). Moreover, there was no enlargement of other lymphatic tissues such as lymph nodes, Peyer patches, or thymus. The number of megakaryocytes was increased in the *p8*<sup>+/+</sup> mice (Fig. 2C), whereas thrombocyte counts were not different between animal strains and did not change with age (Fig. 2D). Differential blood cell count showed slightly increased values of mean corpuscular volume and mean corpuscular hemoglobin concentration in the *p8*<sup>+/+</sup> mice as compared with the *p8*<sup>+/+</sup> mice (Supplemental Digital Content 2A, <http://links.lww.com/MPA/A326>). Reticulocytes, plasmatic transferrin, and ferritin were not different between animal strains (data not shown). The flow cytometric analysis of the spleen revealed a remarkable increase in the percentage of T<sub>reg</sub> in the *p8*<sup>+/+</sup> mice as compared with the control mice ( $P = 0.008$ ; Fig. 2E). Other subsets of the cellular immune system (CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, B220<sup>+</sup>, Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>low/high</sup>, and Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>) were not affected by *p8* knockout (data not shown).

### *p8* Deficiency Results in Severe Hypoplasia of the White Pulp in AP

Deletion of *p8* in mice has been shown to aggravate the course of AP<sup>11</sup>; in addition, although a possible role for leukocyte migration during the course of the disease has been hypothesized, the impact of *p8* on the early and late cellular immune response in



**FIGURE 2.** A, Splenomegaly in mature  $p8$ -deficient ( $p8^{-/-}$ ) mice but not in control ( $p8^{+/+}$ ) mice (volume, 3; weight, 5–6 per group). B, Histologic evaluation from spleens of mature  $p8$ -deficient mice ( $p8^{-/-}$ ). Hematoxylin-eosin staining from  $p8^{-/-}$  and control mice without deletion of  $p8$  ( $p8^{+/+}$ ) showing increased numbers of megakaryocytes (upper panel). Gomori silver staining without signs of irregular arrangement in the reticular fiber meshwork (middle panel). Iron staining with Prussian blue staining shows splenic siderosis in  $p8^{-/-}$  mice (lower panel). C, Quantitative assessment of the number of megakaryocytic cells in spleens of young and old  $p8$ -deficient ( $p8^{-/-}$ ) and control ( $p8^{+/+}$ ) mice reveals a significant increase of megakaryocytes in mature  $p8^{-/-}$  mice. D, Thrombocyte counts were not different between animal strains and young and mature mice ( $n = 5$  per group). E, Percentage of  $T_{\text{reg}}$  ( $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$ ) was significantly increased in mature  $p8^{-/-}$  (20–26 weeks) mice as compared with the control mice. Each dot represents 1 individual mouse. Data pooled from 3 independent experiments. **Editor's note:** A color image accompanies the online version of this article.

AP has not been addressed directly.<sup>12</sup> To assess immune cell phenotype of the  $p8^{-/-}$  mice during AP, the mice received 7 injections of cerulein and were killed at 1 hour and 96 hours after the last injection. Serum levels of amylase and lipase were significantly increased in  $p8^{-/-}$  and  $p8^{+/+}$  mice 1 hour after AP induction ( $P < 0.05$ ) versus control/saline-injected  $p8^{-/-}$  and  $p8^{+/+}$  mice and had normalized at 96 hours. Both groups showed typical histologic lesion in the pancreas (Fig. 3A) and the lung (Supplemental Digital Content 3, <http://links.lww.com/MPA/A326>) 1 hour after induction of AP; although for pancreas, edema and acinar cell apoptosis were more severe in the  $p8^{-/-}$  mice ( $P = 0.016$ ; Table 2; Fig. 3), in concordance to what has been previously reported.<sup>11</sup> Of note, saline treatment in  $p8^{-/-}$  animals caused some apoptosis. After 96 hours, pancreatic lesions were minimal in both experimental

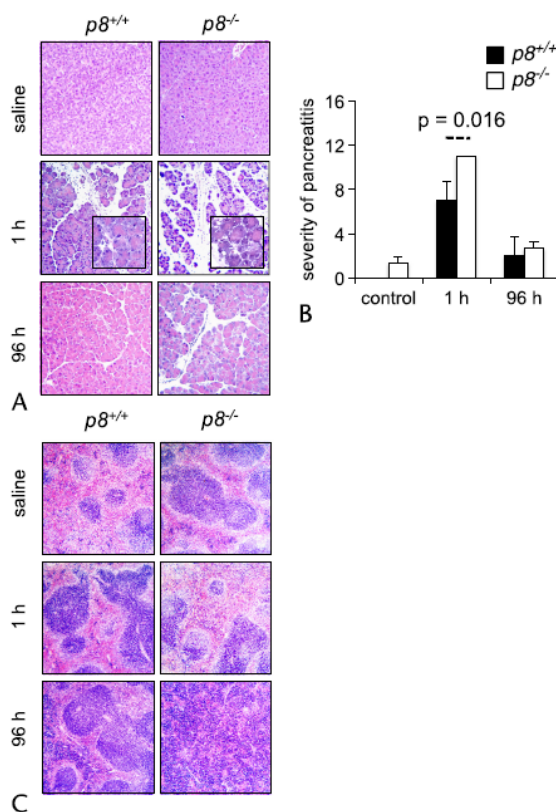
groups (Table 2, Fig. 3). As for the liver, no histologic lesions were seen and serum levels of alanine transaminase, aspartate transaminase, AP, gamma-glutamyl transpeptidase bilirubin, and glucose remained unchanged. In what concerns lymphoid organs, at 1 hour post-AP induction, no lesions were found in the spleen of the  $p8^{-/-}$  and  $p8^{+/+}$  mice. At 96 hours, however, the  $p8^{-/-}$  mice showed severe hypoplasia of the white pulp, with depletion of lymphocytes, accompanied by mild hyperplasia of the red pulp (Fig. 3C).

### Flow Cytometric Analysis Reflects a More Severe Pancreatitis in the $p8$ Knockout Mice

We then determined the composition of lymphocyte subsets and myeloid cells during the course of AP in spleens and in whole



blood. In spleens, there was a significant decrease of CD3<sup>+</sup>T cells in the  $p8^{-/-}$  mice after 96 hours only (mean, 48.3–96 hours; 40.2%,  $P = 0.02$ ). The percentage of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells declined considerably in the  $p8^{-/-}$  mice from 49.2% to 43.3% ( $P = 0.004$ ) and in  $p8^{+/+}$  mice from 54.6% to 45.6% ( $P = 0.002$ ). B lymphocytes increased similarly in both animal strains at 96 hours. In addition, in control animals, there was a small but significant increase in the percentage of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells from saline to 96 hours (32.6%–38%;  $P = 0.03$ ; Fig. 4A). The myeloid cells were not affected. The flow cytometric analysis of the peripheral blood revealed synchronous changes with a decrease of the total CD3<sup>+</sup>T cells after 96 hours ( $P < 0.05$ ), which was most likely caused by a decrease of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells ( $p8^{+/+}$ , 63.7%–56.4%;



**FIGURE 3.** A, Representative HE staining of the pancreas from young  $p8^{-/-}$  and control mice during the course of AP showing a normal pancreas histology in saline controls and few apoptosis in  $p8^{-/-}$  mice. One hour after the last cerulein injection, pancreatic parenchyma reveals clear signs of inflammation and edema that was more pronounced in  $p8^{-/-}$  mice. Inflammation had ceased and parenchyma was reconstituted after 96 hours in both genotypes (original magnification  $\times 50$ , scale bar 100  $\mu$ m). B, Histopathologic score of AP was more severe in  $p8^{-/-}$  mice 1 hour after the induction of the disease ( $P = 0.016$ ). Of note, saline injection in the control animals was sufficient to cause slight apoptosis in  $p8^{-/-}$  mice only. C, Representative HE staining of the spleen. Regular morphology of splenic parenchyma was observed in the saline-treated sham group and 1 hour after induction of AP. After 96 hours, the spleens of  $p8^{-/-}$  mice showed a severe disruption of the white pulp structure, with loss of lymphoid follicles, accompanied by moderate hyperplasia of the red pulp (original magnification  $\times 50$ , scale bar 100  $\mu$ m). **Editor's note:** A color image accompanies the online version of this article.

**TABLE 2.** Detailed Quantitative Assessment of the Severity of AP as Judged by Pancreatic Edema, Lymphocyte Infiltration, Vacuolization, and Acinar Cell Apoptosis Compared Between  $p8^{-/-}$  and Control Mice

Lesion	Group	Score					
		$p8^{+/+}$ (n = 3)			$p8^{-/-}$ (n = 3)		
Edema	Saline	0	0	0	0	0	0
	1 h	1	1	2	4*	3*	3*
	96 h	0	0	1	0	0	1*
Inflammation	Saline	0	0	0	0	0	0
	1 h	1	1	2	1	1	1
	96 h	0	0	1	0	0	0
Vacuolization	Saline	0	0	0	0	0	0
	1 h	1	1	2	2	3	3
	96 h	0	0	0	0	1	0
Necrosis/apoptosis	Saline	0	0	0	2	1	2
	1 h	3	3	3	4	4	4
	96 h	1	1	2	2	2	2
Total	Saline	0	0	0	2	1	1
	1 h	6	6	9	11	11	11
	96 h	1	1	4	2	3	3

Increased severity of pancreatic lesions was seen in the  $p8^{-/-}$  mice that resolved 96 hours after AP induction. Each row represents an individual mouse.

\*With reduced tissue mass.

$P = 0.002$ ). The percentage of CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells increased slightly at 96 hours but were significant only in the  $p8^{+/+}$  mice, most likely by an outlier in the corresponding  $p8^{-/-}$  animal. At 1 hour of AP, there was a significant increase of Gr-1<sup>+</sup>CD11b<sup>low/high</sup> cells ( $P < 0.05$ ) followed by a dramatic decrease at 96 hours ( $P < 0.001$ ) in both animal strains. The percentage of peripheral B-220<sup>+</sup> lymphocytes increased at 96 hours in the  $p8^{+/+}$  mice from 46.6% to 63.7% ( $P = 0.002$ ) and in the  $p8^{-/-}$  mice from 56.9% to 70.6% ( $P = 0.02$ ; Fig. 4B). Circulatory cytokine levels were remarkable for an increase of IL-6 1 hour after AP induction without differences between the 2 animal strains (data not shown). Of note, already, the injection of saline resulted in an unexplained decrease of CD3<sup>+</sup> cells in the  $p8^{-/-}$  mice (Fig. 4B).

### Apoptosis Rate in Spleen Was Increased in the $p8^{-/-}$ Mice in AP

Finally, it was investigated whether apoptosis might account for the severe disruption seen in spleens of the  $p8^{-/-}$  mice. Detection of apoptotic splenocytes using TUNEL showed low-staining signals in the control group and an increase of TUNEL-positive nuclei 1 hour and 96 hours after AP induction. Although there was no difference in the amount of TUNEL-positive staining nuclei between the 2 animal strains after sham treatment or 1 hour after AP induction, there was a significant increase in apoptotic cells in spleens of the  $p8^{-/-}$  mice as compared with the control mice 96 hours after AP induction ( $P = 0.017$ ; Fig. 5).

### DISCUSSION

Acute pancreatitis is a potentially fatal disease whose initial event is a local inflammation as a consequence of pancreatic acinar cell damage. The course of the disease however is determined by a systemic inflammatory response and a subsequent compensatory anti-inflammatory response syndrome.<sup>5</sup> Although a modified

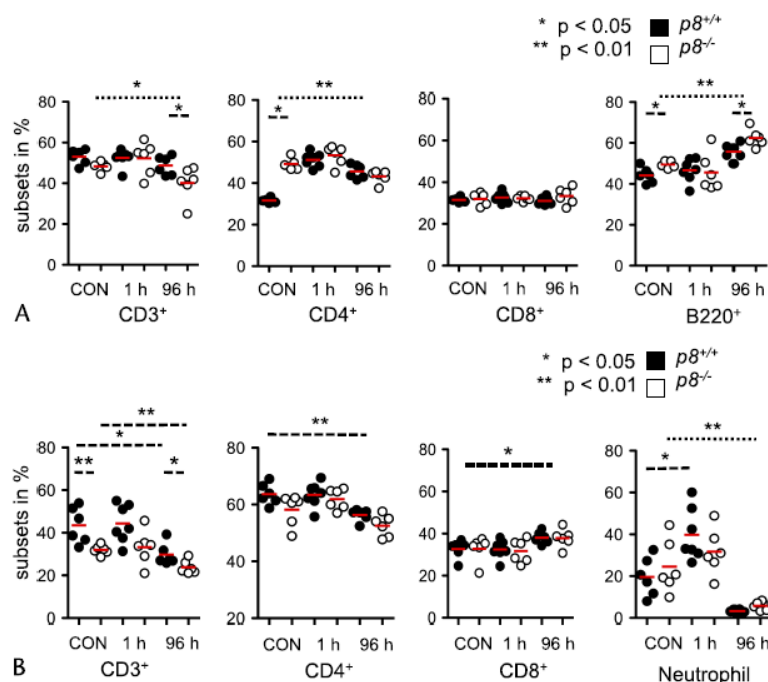


FIGURE 4. Flow cytometric analysis of spleen (A) as well as peripheral (B) lymphocyte and myeloid cellular subsets during the course of AP. CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells are presented as subsets of CD3<sup>+</sup> cells. Each dot represents 1 individual mouse. Data pooled from 3 to 5 independent experiments. Gray lines indicate the average.

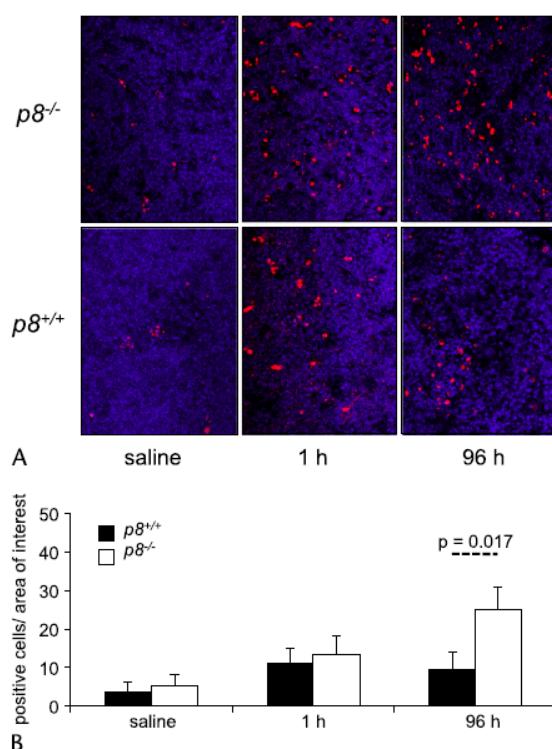
immunologic constitution can predispose to immunologic dysfunction,<sup>25</sup> we aimed to investigate the influence of *p8*, a gene that has been shown to decrease the severity of AP<sup>11</sup> on systemic immunologic changes during the course of the disease.

We show evidence that *p8* does not relevantly influence the maturation and constitution of lymphocytes and myeloid cells in C57BL/6 mice. These findings complete a previous report by Vasseur et al<sup>11</sup> showing that *p8*-deficient mice develop and behave normally. Macroanatomy and microanatomy of primary and secondary lymphoid organs as well as the cellular composition of peripheral and splenic lymphocytes as well as the myeloid cells were not substantially affected by targeted disruption of *p8* in C57BL/6 mice. Interestingly, the mature *p8*<sup>-/-</sup> mice show a marked splenomegaly and splenic siderosis without developing functional hypersplenism because relevant differences in the hematological assessment of the young and mature mice were absent. Taking into consideration the profound changes that occur on the functional level of the myeloid cells in immunosenescence<sup>24,25</sup> and the role of macrophages on erythrophagocytosis and iron homeostasis, it can be speculated from these data that *p8* is involved in proper macrophage function in ageing. In addition, we found increased percentages of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells, enlarged marginal zones, and a significant increased number of megakaryocytes in the spleens of the mature *p8*<sup>-/-</sup> mice. Megakaryocytes could indicate persistent extramedullary hematopoiesis caused by a chronic proinflammatory state in the *p8*<sup>-/-</sup> mice.<sup>26</sup> In this context, T<sub>regs</sub> have been shown to suppress extramedullary hematopoiesis.<sup>27</sup> As such, increased numbers of T<sub>regs</sub> might act in such manner to restore homeostasis of extramedullary hematopoiesis.

We also analyzed the influence of *p8* on the cellular immune response during the course of AP. In concordance with a previous

report,<sup>11</sup> we found histologic lesions of the pancreas to be more severe in the *p8*<sup>-/-</sup> mice as compared with the controls. However, Vasseur et al<sup>11</sup> did not investigate lymphocyte and myeloid subsets or lymphoid organs. We found a time-dependent decrease in CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and neutrophils cells that was accompanied by a compensatory increase in the percentage of B cells during the course of AP. Alterations were more pronounced in the *p8*<sup>-/-</sup> mice. This could reflect the more severe disease course in the *p8*<sup>-/-</sup> mice. Pietruczuk et al<sup>28</sup> reported that, in humans, peripheral B and CD4<sup>+</sup> lymphocytes are depleted in the late phase of AP, whereas CD8<sup>+</sup> lymphocytes are not affected. One major difference to our study is that we examined the percentage of lymphocytes and myeloid cells from 10,000 cells in flow cytometry and did not obtain total cell numbers. Therefore, our data could reflect a stronger decrease of the total number of the CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells as compared with the B cells. We also see no reduction in CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> subsets. During AP, the lymphocytes are recruited from spleens to mobilize additional inflammatory cells first to the circulation and second to the pancreas. This recruitment can even lead to a decrease in splenic weight in severe AP.<sup>29</sup> Hence, the stronger decline of splenic T lymphocytes in the *p8*<sup>-/-</sup> mice might implicate an increased translocation of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells to the site of inflammation and might be interpreted as an indicator for a more severe disease. This would be in accordance with the data from Demols et al<sup>30</sup> who demonstrated that CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> cells are crucially involved in tissue injury during AP. Beyond that, increased peripheral elimination of lymphocytes might contribute to a decrease of T cells. However, another explanation relates to the disruption of the secondary splenic structure and increased TUNEL staining found in the *p8*<sup>-/-</sup> mice—a striking finding of our study. Lymphocyte apoptosis might account for the observed





**FIGURE 5.** TUNEL staining of the spleens during the course of AP. **A.** Quantitative assessment of apoptotic nuclei. Although there were only few apoptotic nuclei in untreated mice, a marked increase was seen 1 hour and 96 hours after disease induction. In contrast to the control mice, TUNEL staining of  $p8^{-/-}$  mice became even more pronounced after 96 hours ( $P = 0.017$ ;  $n = 3$ ). **B.** Representative pictures of TUNEL-stained spleens during the course of AP. saline... vehicle treated mice at 1 h after disease induction. **Editor's note:** A color image accompanies the online version of this article.

histologic changes and for the decrease of the  $CD3^+CD4^+$  cells. From other models of systemic inflammation, such as sepsis, it is known that, to reduce tissue damage, lymphocytes become apoptotic after being activated, a process called *activation-induced cell death* (AICD).<sup>31–34</sup> The systematic activation of T cells has also been described early in AP.<sup>35</sup> Although AICD has not explicitly been studied in AP, apoptosis in spleens was described in rats with severe AP induced by retrograde taurocholate infusion<sup>36</sup> but, as far as we know, not in the cerulein model. Of note,  $p8$  possesses strong antiapoptotic properties.<sup>14,37</sup> Increased apoptosis could therefore reflect a more severe disease course or directly be linked to antiapoptotic actions of  $p8$ .

How could  $p8$  deficiency lead to splenomegaly, siderosis, and increased apoptosis in AP? In another, yet unpublished study of our group, we show evidence that  $p8$  inhibits mitochondrial reactive oxygen species (ROS; Weis et al [unpublished observation]). Mitochondrial ROS formation in the  $p8^{-/-}$  mice was not assessed but could explain all the observed differences between the 2 animal strains. Evidence from Mehlhase et al<sup>38</sup> shows that macrophages with increased oxidative stress degrade ferritin, the iron storage protein, much faster than the control cells. As a consequence, increased ferritin degradation leads to the formation of hemosiderin to counteract iron toxicity and might cause siderosis as seen in the mature  $p8^{-/-}$  mice.<sup>39</sup> In inflammatory conditions,

ROS have been shown to increase the rate of apoptosis as seen in the spleens of the  $p8^{-/-}$  mice in AP.<sup>39,40</sup> Under this assumption, the involvement of the cytokine transforming growth factor  $\beta$  that is able to inhibit AICD and FasL expression by blocking c-Myc signaling can be speculated.<sup>41</sup> Transforming growth factor  $\beta$  has also shown to induce  $p8$  transcription via the SMAD signaling pathway in different human and rodent cell lines.<sup>42,43</sup> Deficiency of  $p8$  might inhibit transforming growth factor  $\beta$ -transmitted antiapoptotic actions on T cells by interacting with c-Myc signaling, which should reduce splenic  $CD3^+CD4^+$  lymphocytes.

In summary, the  $p8^{-/-}$  mice reveal no obvious phenotype in the composition of immune system and splenic constitution. In the mature mice (25 weeks), splenic size and mass are increased as compared with the wild-type mice accompanied by extramedullary megakaryocytosis and isolated splenic siderosis. Discrete morphologic changes in the white pulp seem to occur in immunosenescence in  $p8$  deficiency. In AP, it is conceivable that  $p8$  deficiency impairs immune function and increased apoptotic cell death in activated splenic lymphocytes, most presumably  $CD3^+CD4^+$  cells. To what extent this reflects the more severe course of AP in  $p8^{-/-}$  mice or whether it should be regarded as an independent phenomenon remains to be determined. Functional data might help to elucidate a putative  $p8$  function in the immune system.

## REFERENCES

- Zhang X, Chen H, Liu F, et al. Advances in researches on the immune dysregulation and therapy of severe acute pancreatitis. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2009;10:493–498.
- Petrov MS, Shanbhag S, Chakraborty M, et al. Organ failure and infection of pancreatic necrosis as determinants of mortality in patients with acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2010;139:813–820.
- Shen Y, Cui N, Miao B, et al. Immune dysregulation in patients with severe acute pancreatitis. *Inflammation*. 2010;34:36–42.
- Uehara S, Gothof K, Handa H, et al. Immune function in patients with acute pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2003;18:363–370.
- Mayerle J, Dummer A, Sendler M, et al. Differential roles of inflammatory cells in pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol*. 2012;27:47–51.
- Curley PJ, McMahon MJ, Lancaster F, et al. Reduction in circulating levels of CD4-positive lymphocytes in acute pancreatitis: relationship to endotoxin, interleukin 6 and disease severity. *Br J Surg*. 1993;80:1312–1315.
- Ueda T, Takeyama Y, Yasuda T, et al. Functional alterations of splenocytes in severe acute pancreatitis. *J Surg Res*. 2002;102:161–168.
- Takeyama Y, Takas K, Ueda T, et al. Peripheral lymphocyte reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death. *J Gastrointest Surg*. 2000;4:379–387.
- Xiping Z, Li C, Miao L, et al. Protecting effects of dexamethasone on thymus of rats with severe acute pancreatitis. *Mediators Inflamm*. 2007; 2007:72361.
- Mallo G, Fiedler F, Calvo E, et al. Cloning and expression of the rat  $p8$  cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth. *J Biol Chem*. 1997;272:32360–32369.
- Vasseur S, Folch-Puy E, Hlouschek V, et al.  $p8$  improves pancreatic response to acute pancreatitis by enhancing the expression of the anti-inflammatory protein pancreatitis-associated protein I. *J Biol Chem*. 2004;279:7199–7207.
- Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia-Montero A, et al. Mice with targeted disruption of  $p8$  gene show increased sensitivity to lipopolysaccharide and DNA microarray analysis of livers reveals an aberrant gene expression response. *BMC Gastroenterol*. 2003;3:25.

13. Malicet C, Lesavre N, Vasseur S, et al. p8 inhibits the growth of human pancreatic cancer cells and its expression is induced through pathways involved in growth inhibition and repressed by factors promoting cell growth. *Mol Cancer*. 2003;2:37.
14. Goruppi S, Iovanna J. Stress-inducible protein p8 is involved in several physiological and pathological processes. *J Biol Chem*. 2010;285:1577–1581.
15. Cano C, Hamidi T, Sandi MJ, et al. Role of the stress protein p8 in tumor progression and development of metastasis. *Pathol Biol (Paris)*. 2009;59:303–308.
16. Vasseur S, Vidal Mallo G, Fiedler F, et al. Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity. *Eur J Biochem*. 1999;259:670–675.
17. Chinn IK, Blackburn CC, Manley NR, et al. Changes in primary lymphoid organs with aging. *Semin Immunol*. 2012;24:309–320.
18. High KP, Akbar AN, Nikolich-Zugich J. Translational research in immune senescence: assessing the relevance of current models. *Semin Immunol*. 2012;24:373–382.
19. Vasseur S, Hoffmeister A, Garcia-Montero A, et al. p8-deficient fibroblasts grow more rapidly and are more resistant to adriamycin-induced apoptosis. *Oncogene*. 2002;21:1685–1694.
20. Rongione AJ, Kusske AM, Kwan K, et al. Interleukin 10 reduces the severity of acute pancreatitis in rats. *Gastroenterology*. 1997;112:960–967.
21. Lagasse E, Weissman IL. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods*. 1996;197:139–150.
22. Fricke S, Rothe K, Hilger N, et al. Allogeneic bone marrow grafts with high levels of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) T cells can lead to engraftment failure. *Cytometry A*. 2012;81:476–488.
23. Junt T, Scandella E, Ludewig B. Form follows function: lymphoid tissue microarchitecture in antimicrobial immune defence. *Nat Rev Immunol*. 2008;8:764–775.
24. Birjandi SZ, Ippolito JA, Ramadorai AK, et al. Alterations in marginal zone macrophages and marginal zone B cells in old mice. *J Immunol*. 2011;186:3441–3451.
25. Globerson A, Effros RB. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. *Immunol Today*. 2000;21:515–521.
26. Suttie AW. Histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol*. 2006;34:466–503.
27. Lee JH, Wang C, Kim CH. FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells restrain splenic extramedullary myelopoiesis via suppression of hemopoietic cytokine-producing T cells. *J Immunol*. 2009;183:6377–6386.
28. Pietruczuk M, Dabrowska M, Wereszczynska-Siemiatkowska U, et al. Alteration of peripheral blood lymphocyte subsets in acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12:5344–5351.
29. Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, et al. Splenic atrophy in experimental severe acute pancreatitis. *Pancreas*. 2002;24:365–372.
30. Demols A, Le Moine O, Desalle F. CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice. *Gastroenterology*. 2000;118:582–590.
31. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in humans. *J Immunol*. 2001;166:6952–6963.
32. Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev*. 2003;193:70–81.
33. Hotchkiss R, Karl I. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348:138–150.
34. Murphy FJ, Hayes I, Cotter TG. Targeting inflammatory diseases via apoptotic mechanisms. *Curr Opin Pharmacol*. 2003;3:412–419.
35. Sweeney KJ, Kell MR, Coates C, et al. Serum antigen(s) drive the proinflammatory T cell response in acute pancreatitis. *Br J Surg*. 2003;90:313–319.
36. XP Zhang, Tian H, Wu DJ, et al. Pathological changes in multiple organs of rats with severe acute pancreatitis treated by baicalin and octreotide. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2009;8:85–92.
37. Su SB, Motoo Y, Iovanna JL, et al. Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(5):1320–1324.
38. Mehlhase J, Sandig G, Pantopoulos K, et al. Oxidation-induced ferritin turnover in microglial cells: role of proteasome. *Free Radic Biol Med*. 2005;38:276–285.
39. Koorts AM, Viljoen M. Acute phase proteins: ferritin and ferritin isoforms, acute phase proteins—regulation and functions of acute phase proteins. Prof. Francisco Veas (Ed.) ISBN: 978-953-307-252-4, InTech, 2011.
40. Pham CG, Bubici C, Zazzeroni F, et al. Ferritin heavy chain upregulation by NF-kappaB inhibits TNFalpha-induced apoptosis by suppressing reactive oxygen species. *Cell*. 2004;119:529–542.
41. Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, et al. Transforming growth factor beta1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of c-Myc. *J Exp Med*. 1999;189:231–239.
42. Garcia-Montero AC, Vasseur S, Giono LE, et al. Transforming growth factor beta-1 enhances Smad transcriptional activity through activation of p8 gene expression. *Biochem J*. 2001;357:249–253.
43. Pommier RM, Gout J, Vincent DF, et al. The human NUPR1/p8 gene is transcriptionally activated by transforming growth factor beta via the SMAD signalling pathway. *Biochem J*. 2012;445:285–293.

## 5 Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Titel: Einfluss des Proteins p8 auf das Immunsystem im Verlauf der akuten Pankreatitis im Mausmodell

Eingereicht von: Tilmann Cornelius Schlaich

Angefertigt an: Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie,  
Department für Innere Medizin, Neurologie und Dermatologie,  
Universitätsklinikum Leipzig

Betreut von: PD Dr. med. habil. Albrecht Hoffmeister  
Prof. Dr. med. Joachim Mössner  
Dr. med. Sebastian Weis

Monat und Jahr der Einreichung: November 2014

Die akute Pankreatitis (AP) ist eine Entzündung der Bauchspeicheldrüse, bei der unterschiedliche Auslöser zu einer Schädigung der exokrinen Azinuszellen führen (Waldthaler, Schütte & Malfertheiner 2010). Die intraazinär in Vesikel gespeicherten, inaktiven Verdauungsenzyme werden dabei unkontrolliert aktiviert und führen zu einer Selbstverdauung des Pankreasgewebes (Hofbauer et al. 1998). Als Reaktion auf die Gewebeschädigung wandern Zellen des Immunsystems zum Entzündungsort (Shrivastava & Bhatia 2010). Durch Einbeziehung des Immunsystems folgt auf die zunächst lokal im Organ ablaufende Inflammation eine komplexe Kaskade systemischer pro- und antiinflammatorischer Prozesse (Weber & Adler 2001). Diese Störung der immunologischen Homöostase ist ein Schlüsselereignis und bestimmt als Auslöser von Komplikationen wie einzelner Organdysfunktionen den klinischen Verlauf der AP maßgeblich (Bhatia 2005; Bone 1996). Welche genauen Faktoren die Immunreaktionen regulieren, beeinflussen und hierdurch den Schweregrad der AP bestimmen, ist bisher nicht eindeutig beantwortet (Zhang et al. 2009).

Das Protein p8 ist ein DNA-bindender Transkriptionscofaktor, der durch verschiedene Arten von Zellstress induziert werden kann (Mallo et al. 1997; Goruppi & Iovanna 2010). Außer im Pankreas konnte diese Eigenschaft nach LPS-Stimulation sowohl in Leber- und Nierenzellen (Jiang et al. 1999) als auch in immunologischen Geweben wie Thymus und Milz nachgewiesen werden (A. Hoffmeister, unveröffentlichte Daten).

Im Tiermodell der experimentellen AP attenuiert p8 die gewebeschädigenden Prozesse im Pankreas. Demonstriert wurde dies in einer *p8*-knock-out-Mauslinie anhand eines histologisch schwereren Verlaufs (Vasseur et al. 2003a). Gleichzeitig wiesen *p8*-defiziente Mäuse im LPS-induzierten Sepsismodell eine drastisch erhöhte Sterblichkeit auf (Vasseur et al. 2003b). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde eine zytoprotektive Wirkung von p8 im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen postuliert. An dem bei azinärem Zellstress veränderten Genexpressionsmuster im Sinne eines möglichen genetischen Notfallprogramms soll p8 beteiligt sein und u.a. die Expression zytoprotektiver Proteine wie dem Pankreatitis-assoziierten Protein I steuern, das lokal antiinflammatorisch wirkt (Vasseur et al. 2003a; Savkovic et al. 2004). Es ist im Kontext der AP als einer Krankheit mit systemischen inflammatorischen Veränderungen bisher jedoch nicht beschrieben, ob p8 außer im Pankreas in Immunprozesse eingreifen und so den Krankheitsverlauf modulieren kann.

Im Kern sollte die vorliegende Arbeit einen Zusammenhang des Proteins p8 mit dem Immunsystem im etablierten Tiermodell einer genetisch veränderten C57BL6J-Mauslinie ohne intakte p8-Expression (*p8*<sup>-/-</sup>-Linie) untersuchen. Als Kontrollgruppe diene eine C57BL6/J-Wildtyp-Linie (*p8*<sup>+/+</sup>). Es sollte erstens ein möglicher Einfluss von p8 auf Entwicklung und Konstitution des zellulären Immunsystems in jungen (10-12 Wochen) und seneszenten (20-24 Wochen) Mäusen geprüft werden. Zweitens sollte die Rolle von p8 auf immunologisch-pathophysiologische Vorgänge während einer Caerulein-induzierten ödematösen Pankreatitis geprüft werden. Methodisch erfolgte eine vergleichende Immunphänotypisierung mit verschiedenen histologischen und immunhistochemischen Gewebeuntersuchungen sowie durchflusszytometrischen Zellanalysen.

Junge naive *p8*<sup>-/-</sup>-Mäuse wiesen im Vergleich zum Wildtyp keine Unterschiede bei Fortpflanzung, Entwicklung und der makroskopischen Organogenese auf. Lichtmikroskopisch bestätigte sich in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Pankreas, Leber, Lunge und Darm eine unauffällige histologische Morphologie. Bei *p8*-Defizienz zeigte sich das primäre und sekundäre lymphatische Gewebe (Milz, Thymus, periphere und mesenteriale Lymphknoten) regelrecht und ohne Aberranz in der Übersichtsfärbung. Die ergänzende Immunhistochemie auf B- und T-Lymphozyten sowie myeloide Zellen ergab eine ungestörte Mikroarchitektur ebenso wie die Färbungen zur Darstellung der



extrazellulären Matrix (Elastika-van-Gieson, Resorcin-Fuchsin, Versilberung nach Gomori). Durchflusszytometrische Analysen zeigten lediglich einen geringeren Anteil an monozytären Zellen in Milz und Vollblut der  $p8^{-/-}$ -Linie, während die übrigen Subpopulationen (B- und T-Lymphozyten, Granulozyten) in diesen beiden Immunkompartimenten ohne signifikante Unterschiede waren. Die maschinelle Differenzierung des Blutbilds ergab kein Hinweis auf eine hämatologische Störung oder Knochenmarkinsuffizienz. Auf die Entwicklung und Reifung verschiedener Organsysteme hat  $p8$  in jungen Tieren somit keinen phänotypisch erfassbaren Einfluss bzw. kann eine  $p8$ -Defizienz vom Organismus kompensiert werden.

Eine äquivalente Immuntypisierung wurde zur Erfassung möglicher Unterschiede während der immunologischen Alterung, der Immunseneszenz, wiederholt. Hierbei fiel in der  $p8$ -defizienten Mauslinie die Entwicklung einer signifikanten Splenomegalie auf. Eine Hyperplasie des anderen lymphatischen Gewebes lag nicht vor, hämatologisch ließ sich eine lymphoproliferative Erkrankung ausschließen. Eine Leberzirrhose als Ursache wurde histologisch ausgeschlossen. Lichtmikroskopisch wiesen die vergrößerten Milzen der  $p8^{-/-}$ -Linie einerseits ein vermehrtes Vorkommen von Megakaryozyten als Indikator der Thrombopoese (Harker 1968) bzw. einer extramedullären, milzständigen Hämatopoese auf. Andererseits ließ sich mit der Berliner-Blau-Färbung eine Siderose mit gesteigerter Eisenakkumulation in der roten Milzpulpa darstellen. Andere Organe waren hiervon nicht betroffen, die Plasmakonzentrationen von Transferrin und Ferritin lagen im Referenzbereich. Hämatologisch ließ sich ein durch die Splenomegalie bedingtes Hyperspleniesyndrom ausschließen, die Thrombozytenzahl war nicht signifikant erhöht. Immunhistochemisch zeigten sich keine Auffälligkeiten, jedoch ergab die FACS-Analyse der Milzlymphozyten ein signifikant erhöhtes Vorkommen regulatorischer T-Lymphozyten ( $T_{\text{regs}}$ ). Zusammenfassend führt die  $p8$ -Defizienz erst in der Immunseneszenz zu morphologischen Veränderungen mit Entwicklung einer Splenomegalie. Eine lokale milzständige extramedulläre Hämatopoese könnte nach Ausschluss anderer Gründe eine Ursache sein, der erhöhte Anteil von  $T_{\text{regs}}$  ein reaktives Phänomen zur Regulation der EMH (Lee, Wang & Kim 2009). Der Stimulus zur Induktion der EMH ist nicht bekannt, eine chronische Inflammation in der Milz als zentralem Organ der Blutfilterung mit hoher Antigenexposition ist denkbar.

Nach den Untersuchungen am unstimulierten Immunsystem erfolgte eine Wiederholung der Analysen unter den pathophysiologischen Bedingungen einer akuten Pankreatitis. Ziel war es, einen Einfluss von  $p8$  auf das Immunsystem anhand möglicher Unterschiede in der Immunmorphologie während der AP zu erkennen, die den beobachteten schwereren Verlauf nach  $p8$ -Deletion erklären könnten. Als Krankheits-

modell wurde das der ödematösen Pankreatitis durch intraperitoneale Injektion von Caerulein gewählt. Die Induktion der AP wurde durch Aktivitätsanstieg von  $\alpha$ -Amylase und Lipase im Plasma bestätigt. Laborchemisch bestand kein Unterschied zwischen der  $p8^{-/-}$ - und Wildtyplinie. Die Werte für alkalische Phosphatase,  $\gamma$ -Glutamyltransferase, Bilirubin, Blutglukose und Lebertransaminasen lagen im Referenzbereich. Die im zytometrischen Immunassay gemessenen Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-10 und Interferon- $\gamma$  während der AP waren normwertig. Lediglich IL-6 zeigte in der Akutphase einen Anstieg ohne Unterschied zwischen den Gruppen.

Zur Erfassung der immunzellulären Beteiligung im Zeitverlauf der AP wurden durchflusszytometrische Quantifizierungen aus Vollblut- und Milzproben durchgeführt. Es zeigte sich eine deutlichere Abnahme der zirkulierenden und im Milzspeicher vorhandenen  $CD3^{+}CD4^{+} T_{\text{Helfer}}$ -Lymphozyten in der  $p8^{-/-}$ - als in der Kontrollgruppe. In beiden Linien war die Subpopulation der  $CD3^{+}CD8^{+}$  T-Zellen nicht betroffen bei relativer Zunahme der  $B220^{+}$ -Lymphozyten. Die myeloiden Zellen im Blut (neutrophile Granulozyten und Makrophagen) zeigten einen Anstieg in der Akutphase mit Signifikanz nur in der Kontrollgruppe. Da den  $CD3^{+}CD4^{+}$  T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle bei der Regulation der an den gewebeschädigenden Prozessen beteiligten myeloiden Zellen zugeschrieben wird (Demols et al. 2000), kann das Ausmaß ihrer Rekrutierung aus der Milz über die Blutzirkulation in das Pankreas als Spiegel eines schwereren Krankheitsverlaufs und vermehrtem Verbrauch von immunologischen Ressourcen gewertet werden.

Histopathologisch bestätigte sich der initial schwerere AP-Verlauf bei der  $p8^{-/-}$ -Mauslinie mit dem Bild verstärkter pankreatischer Gewebeschädigung. Nach 96 Stunden hatten sich die histologischen Läsionen in beiden Gruppen zurückgebildet. Das untersuchte Lebergewebe unterlag keinen histologischen Veränderungen, während sich die Beteiligung des Lungengewebes mit leukozytärer Inflammation und Verdickung der Alveolarwände deutlich, aber zwischen den Gruppen nicht unterschiedlich darstellte. Der auffälligste Befund zeigte sich in der Phase der Immunrekonstitution 96 Stunden nach AP-Induktion. In Milzen von  $p8^{-/-}$ -Mäusen trat eine schwere Hypoplasie der weißen Pulpa mit Strukturverlust der Lymphfollikel und eine Hyperplasie der roten Pulpa auf.

Zur Klärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen den beiden beobachteten Phänomenen, einerseits der im FACS gemessenen Reduktion der  $CD3^{+}CD4^{+} T_{\text{Helfer}}$ -Lymphozyten und andererseits der gestörten zellulären Anordnung der weißen Milzpulpa, wurde das Milzgewebe mit der TUNEL-Methode auf das Vorkommen von Apoptosen untersucht. Bereits 1 Stunde nach Induktionsphase zeigte sich dabei eine Zunahme TUNEL-positiver Zellen in beiden Mauslinien. Nach 96 Stunden stieg in  $p8^{-/-}$ -

Mäusen die Zahl an lymphozytären Apoptosen weiter an und lag signifikant über der Kontrollgruppe, in welcher die Apoptoserate wieder abnahm.

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass das Gen *p8* mit seinem Genprodukt an immunologischen Vorgängen während der Immunseneszenz und in der Pathophysiologie der AP beteiligt ist. Einhergehend mit dem schwereren Verlauf der AP bei *p8*-Defizienz findet sich in der Studie u.a. ein Strukturverlust der Milzpulpa in der Phase der Immunrekonstitution. Gleichzeitig lässt sich erstmals das Auftreten von Apoptosen in Milzlymphozyten beim Caerulein-Modell der AP beschreiben. Dies lässt vermuten, dass während der akuten Pankreatitis T-Lymphozyten außer im entzündeten Pankreasgewebe auch in der Milz eliminiert werden. Unbekannt ist, ob lymphozytäre Apoptosen eine Ursache oder Folge der beobachteten Mikroarchitekturstörung der weißen Pulpa darstellen.

Ein Einfluss von *p8* auf apoptotische Signalwege wurde bereits in Tumorgeweben nachgewiesen (Ito et al. 2005b; Su et al. 2001; Ree et al. 2000). In Pankreas- und Mammakarzinomzellen wirkt *p8* antiapoptotisch (Su et al. 2001; Ito et al. 2005a), wobei molekulare Interaktionen von *p8* in Signalkaskaden der Apoptose bisher nicht entschlüsselt sind. Die nun vorliegenden Befunde lassen vermuten, dass *p8* in seiner Eigenschaft als stressinduzierbares Protein auch unter inflammatorischen Bedingungen einer AP eine Rolle bei der Steuerung der systemischen Antwortreaktion spielt. Ein regulatives Element stellt dabei die Apoptose zur Inaktivierung der an der Inflammation beteiligten Lymphozyten und somit Terminierung der Entzündung dar (Hildeman et al. 2007). Antiapoptotische Effekte von *p8* könnten folglich in Lymphozyten inhibierend auf den programmierten Zelltod wirken und dessen Ausmaß limitieren. Gestützt werden kann diese Vermutung durch die gezeigten Ergebnisse, dass *p8*-Defizienz im *in-vivo* Tiermodell mit einer höheren Apoptoserate der Lymphozyten assoziiert ist.

Da die kausalen Zusammenhänge anhand der bisherigen Daten allein nicht geklärt werden können, sind weiterführende Experimente notwendig, um genauere Erkenntnisse zum Einfluss von *p8* auf die Funktion von Lymphozyten im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen zu erhalten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adib-Conquy, M & Cavaillon, J 2009, 'Compensatory anti-inflammatory response syndrome', *Thrombosis and Haemostasis*, vol. 101, no. 1, pp. 36–47.
- Andoh, A, Takaya, H, Saotome, T, Shimada, M, Hata, K, Araki, Y, Nakamura, F, Shintani, Y, Fujiyama, Y & Bamba, T 2000, 'Cytokine regulation of chemokine (IL-8, MCP-1, and RANTES) gene expression in human pancreatic periacinar myofibroblasts', *Gastroenterology*, vol. 119, no. 1, pp. 211–219.
- Apte, MV, Pirola, RC & Wilson, JS 2012, 'Pancreatic stellate cells: a starring role in normal and diseased pancreas', *Frontiers in Physiology*, vol. 3.
- Bang, U, R. Semb, S, Nøjgaard, C & Bendtsen, F 2008, 'Pharmacological approach to acute pancreatitis', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 14, no. 19.
- Banks, PA, Bollen, TL, Dervenis, C, Gooszen, HG, Johnson, CD, Sarr, MG, Tsiotos, GG & Vege, SS 2012, 'Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus', *Gut*, vol. 62, no. 1, pp. 102–111.
- Beger, HG, Bittner, R, Block, S & Buchler, M 1986, 'Bacterial contamination of pancreatic necrosis. A prospective clinical study', *Gastroenterology*, vol. 91, no. 2, pp. 433–438.
- Bhatia, M 2004, 'Apoptosis versus necrosis in acute pancreatitis', *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology*, vol. 286.
- Bhatia, M 2005, 'Inflammatory response on the pancreatic acinar cell injury', *Scandinavian Journal of Surgery*, vol. 94, no. 2, pp. 97–102.
- Bhatia, M, Brady, M, Shokuhi, S, Christmas, S, Neoptolemos, JP & Slavin, J 2000, 'Inflammatory mediators in acute pancreatitis', *The Journal of Pathology*, vol. 190, no. 2, pp. 117–125.
- Bhatia, M, Wallig, M, Hofbauer, B, Lee, HS, Frossard, JL, Steer, M & Saluja, AK 1998, 'Induction of Apoptosis in Pancreatic Acinar Cells Reduces the Severity of Acute Pancreatitis', *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 246, no. 2.
- Bhatia, M, Wong, FL, Cao, Y, Lau, HY, Huang, J, Puneet, P & Chevali, L 2005, 'Pathophysiology of acute pancreatitis', *Pancreatology*, vol. 5, 2-3, pp. 132–144.
- Bone, RC 1996, 'Immunological dissonance: A continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS)', *Annals of Internal Medicine*, vol. 125, no. 8.
- Bone, RC, Grodzin, CJ & Balk, RA 1997, 'Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process', *Chest*, vol. 112, no. 1, pp. 235–243.
- Brennan, RG & Matthews, BW 1989, 'Structural basis of DNA-protein recognition', *Trends in biochemical sciences*, vol. 14, no. 7, pp. 286–290.
- Brown, SB & Savill, J 1999, 'Phagocytosis triggers macrophage release of Fas ligand and induces apoptosis of bystander leukocytes', *Journal of immunology*, vol. 162, no. 1, pp. 480–485.
- Carracedo, A, Lorente, M, Egia, A, Blazquez, C, Garcia, S, Giroux, V, Malicet, C, Villuendas, R, Gironella, M, Gonzalez-Feria, L, Piris, MA, Iovanna, JL, Guzman, M & Velasco, G 2006, 'The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells', *Cancer cell*, vol. 9, no. 4, pp. 301–312.

- Chowdhury, UR, Samant, RS, Fodstad, O & Shevde, LA 2009, 'Emerging role of nuclear protein 1 (NUPR1) in cancer biology', *Cancer metastasis reviews*, vol. 28, 1-2, pp. 225–232.
- Christophi, C, McDermott, F & Hughes, ES 1985, 'Prognostic significance of the absolute lymphocyte count in acute pancreatitis', *American Journal of Surgery*, vol. 150, no. 3, pp. 295–296.
- Cicalese, L, Sahai, A, Sileri, P, Rastellini, C, Subbotin, V, Ford, H & Lee, K 2001, 'Acute pancreatitis and bacterial translocation', *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 46, no. 5, pp. 1127–1132.
- Closa, D, Motoo, Y & Iovanna, JL 2007, 'Pancreatitis-associated protein: from a lectin to an anti-inflammatory cytokine', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 13, no. 2, pp. 170–174.
- Curley, PJ, McMahon, MJ, Lancaster, F, Banks, RE, Barclay, GR, Shefta, J, Boylston, AW & Whicher, JT 1993, 'Reduction in circulating levels of CD4-positive lymphocytes in acute pancreatitis: relationship to endotoxin, interleukin 6 and disease severity', *The British Journal of Surgery*, vol. 80, no. 10, pp. 1312–1315.
- Curley, P, Nestor, M, Collins, K, Saporoschetz, I, Mendez, M, Mannick JA & Rodrick ML 1996, 'Decreased interleukin-2 production in murine acute pancreatitis: Potential for immunomodulation', *Gastroenterology*, Volume 110, No.2.
- Demols, A, Le Moine, O, Desalle, F, Quertinmont, E, van Laethem, JL & Deviere, J 2000, 'CD4(+) T cells play an important role in acute experimental pancreatitis in mice', *Gastroenterology*, vol. 118, no. 3, pp. 582–590.
- Dios, ID 2010, 'Inflammatory role of the acinar cells during acute pancreatitis', *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology and Therapeutics*, vol. 1, no. 1, p. 15.
- Duffield, JS, Erwig, LP, Wei, X, Liew, FY, Rees, AJ & Savill, JS 2000, 'Activated macrophages direct apoptosis and suppress mitosis of mesangial cells', *Journal of immunology*, vol. 164, no. 4, pp. 2110–2119.
- Encinar, JA, Mallo, GV, Mizyrycki, C, Giono, L, Gonzalez-Ros, JM, Rico, M, Canepa, E, Moreno, S, Neira, JL & Iovanna, JL 2001, 'Human p8 is a HMG-I/Y-like protein with DNA binding activity enhanced by phosphorylation', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 4, pp. 2742–2751.
- Evan, GI & Vousden, KH 2001, 'Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer', *Nature*, vol. 411, no. 6835, pp. 342–348.
- Frossard, JL, Saluja, AK, Bhagat, L, Lee, HS, Bhatia, M, Hofbauer, B & Steer, ML 1999, 'The Role of Intercellular Adhesion Molecule 1 and Neutrophils in Acute Pancreatitis and Pancreatitis-Associated Lung Injury', *Gastroenterology*, vol. 116, no. 3.
- Frossard, J & Pastor, CM 2002, 'Experimental acute pancreatitis: new insights into the pathophysiology', *Frontiers in Bioscience: a Journal and Virtual Library*. Available from: <https://www.bioscience.org/2002/v7/d/frossard/fulltext.htm>.
- Frossard, J, Steer, ML & Pastor, CM 2008, 'Acute pancreatitis', *The Lancet*, vol. 371, no. 9607, pp. 143–152.
- Garcia-Montero, A, Vasseur, S, Mallo, GV, Soubeyran, P, Dagorn, JC & Iovanna, JL 2001, 'Expression of the stress-induced p8 mRNA is transiently activated after culture medium change', *European journal of cell biology*, vol. 80, no. 11, pp. 720–725.
- Goldie, AS, Fearon, KC, Ross, JA, Barclay, GR, Jackson, RE, Grant, IS, Ramsay, G, Blyth, AS & Howie, JC 1995, 'Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. The Sepsis Intervention Group', *Journal of the American Medical Association*, vol. 274, no. 2, pp. 172–177.

- Goruppi, S, Bonventre, JV & Kyriakis, JM 2002, 'Signaling pathways and late-onset gene induction associated with renal mesangial cell hypertrophy', *The EMBO journal*, vol. 21, no. 20, pp. 5427–5436.
- Goruppi, S & Iovanna, JL 2010, 'Stress-inducible Protein p8 Is Involved in Several Physiological and Pathological Processes', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 3, pp. 1577–1581.
- Goruppi, S, Patten, RD, Force, T & Kyriakis, JM 2007, 'Helix-loop-helix protein p8, a transcriptional regulator required for cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast matrix metalloprotease induction', *Molecular and cellular biology*, vol. 27, no. 3, pp. 993–1006.
- Graf, R, Schiesser, M, Lüssi, A, Went, P, Scheele, GA & Bimmler, D 2002, 'Coordinate regulation of secretory stress proteins (PSP/reg, PAP I, PAP II, and PAP III) in the rat exocrine pancreas during experimental acute pancreatitis', *The Journal of surgical research*, vol. 105, no. 2, pp. 136–144.
- Greenbaum, L, Hirshkowitz, A & Shoichet, I 1959, 'The Activation of Trypsinogen by Cathepsin B', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 234, no. 11.
- Green, DR, Droin, N & Pinkoski, M 2003, 'Activation-induced cell death in T cells', *Immunological reviews*, vol. 193, pp. 70–81.
- Gregory, CD & Devitt, A 2004, 'The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically?', *Immunology*, vol. 113, no. 1, pp. 1–14.
- Gukovskaya, AS & Gukovsky, I 2012, 'Autophagy and pancreatitis', *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 303, no. 9, pp. G993.
- Gukovskaya, AS, Gukovsky, I, Zaninovic, V, Song, M, Sandoval, D, Gukovsky, S & Pandol, S 1997, 'Pancreatic acinar cells produce, release, and respond to tumor necrosis factor- $\alpha$ . Role in regulating cell death and pancreatitis', *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 100, no. 7.
- Halangk, W, Lerch, MM, Brandt-Nedele, B, Roth, W, Ruthenberger, M, Reinheckel, T, Domschke, W, Lippert, H, Peters C. & Deussing, J 2000, 'Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis', *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 106, no. 6.
- Halonen, K, Pettilä, V, Leppäniemi, A, Kemppainen, E, Poulakkainen, P & Haapiainen, R 2002, 'Multiple organ dysfunction associated with severe acute pancreatitis', *Critical Care Medicine*, vol. 30, no. 6.
- Harker, LA 1968, 'Kinetics of thrombopoiesis', *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 47, no. 3, pp. 458–465.
- Heller, A, Fiedler, F, Schmeck, J, Lück, V, Iovanna, JL & Koch, T 1999, 'Pancreatitis-associated protein protects the lung from leukocyte-induced injury', *Anesthesiology*, vol. 91, no. 5, pp. 1408–1414.
- Hildeman, D, Jorgensen, T, Kappler, J & Marrack, P 2007, 'Apoptosis and the homeostatic control of immune responses', *Current opinion in immunology*, vol. 19, no. 5, pp. 516–521.
- Hock, R, Furusawa, T, Ueda, T & Bustin, M 2007, 'HMG chromosomal proteins in development and disease', *Trends in cell biology*, vol. 17, no. 2, pp. 72–79.
- Hofbauer, B, Saluja, AK, Lerch, MM, Bhagat, L, Bhatia, M, Lee, HS, Frossard, JL, Adler, G & Steer, ML 1998, 'Intra-acinar cell activation of trypsinogen during caerulein-induced pancreatitis in rats', *The American journal of physiology*, vol. 275, 2 Pt 1, pp. G352–62.
- Hoffmeister, A, Ropolo, A, Vasseur, S, Mallo, GV, Bodeker, H, Ritz-Laser, B, Dressler, GR, Vaccaro, MI, Dagorn, J, Moreno, S & Iovanna, JL 2002, 'The HMG-I/Y-related

- protein p8 binds to p300 and Pax2 trans-activation domain-interacting protein to regulate the trans-activation activity of the Pax2A and Pax2B transcription factors on the glucagon gene promoter', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 25, pp. 22314–22319.
- Hotchkiss, RS, Swanson, PE, Cobb, JP, Jacobson, A, Buchman, TG & Karl, IE 1997, 'Apoptosis in lymphoid and parenchymal cells during sepsis: findings in normal and T- and B-cell-deficient mice', *Critical Care Medicine*, vol. 25, no. 8, pp. 1298–1307.
- Hotchkiss, RS, Swanson, PE, Freeman, BD, Tinsley, KW, Cobb, JP, Matuschak, GM, Buchman, TG & Karl, IE 1999, 'Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction', *Critical Care Medicine*, vol. 27, no. 7, pp. 1230–1251.
- Hotchkiss, RS, Tinsley, KW & Karl, IE 2003, 'Role of Apoptotic Cell Death in Sepsis', *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, vol. 35, no. 9, pp. 585–592.
- Hotchkiss, RS, Tinsley, KW, Swanson, PE, Schmiege, RE, Hui, JJ, Chang, KC, Osborne, DF, Freeman, BD, Cobb, JP, Buchman, TG & Karl, IE 2001, 'Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans', *Journal of immunology*, vol. 166, no. 11, pp. 6952–6963.
- Iovanna, JL 2002, 'Expression of the stress-associated protein p8 is a requisite for tumor development', *International journal of gastrointestinal cancer*, vol. 31, 1-3, pp. 89–98.
- Iovanna, JL, Keim, V, Michel, R & Dagorn, JC 1991, 'Pancreatic gene expression is altered during acute experimental pancreatitis in the rat', *The American journal of physiology*, vol. 261, 3 Pt 1, pp. G485-9.
- Ito, Y, Yoshida, H, Motoo, Y, Iovanna, JL, Nakamura, Y, Kakudo, K, Uruno, T, Takamura, Y, Miya, A, Noguchi, S, Kuma, K & Miyauchi, A 2005a, 'Expression of p8 protein in breast carcinoma; an inverse relationship with apoptosis', *Anticancer research*, vol. 25, 2A, pp. 833–837.
- Ito, Y, Yoshida, H, Motoo, Y, Iovanna, JL, Tomoda, C, Uruno, T, Takamura, Y, Miya, A, Kobayashi, K, Matsuzuka, F, Kuma, K & Miyauchi, A 2005b, 'Expression of p8 protein in medullary thyroid carcinoma', *Anticancer research*, vol. 25, no. 5, pp. 3419–3423.
- Jiang, WG, Davies, G & Fodstad, O 2005, 'Com-1/P8 in oestrogen regulated growth of breast cancer cells, the ER-beta connection', *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 330, no. 1, pp. 253–262.
- Jiang, WG, Davies, G, Martin, TA, Kynaston, H, Mason, MD & Fodstad, O 2006, 'Com-1/p8 acts as a putative tumour suppressor in prostate cancer', *International journal of molecular medicine*, vol. 18, no. 5, pp. 981–986.
- Jiang, YF, Vaccaro, MI, Fiedler, F, Calvo, EL & Iovanna, JL 1999, 'Lipopolysaccharides induce p8 mRNA expression in vivo and in vitro', *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 260, no. 3, pp. 686–690.
- Kapturczak, MH, Wasserfall, C, Brusko, T, Campbell-Thompson, M, Ellis, TM, Atkinson, MA & Agarwal, A 2004, 'Heme oxygenase-1 modulates early inflammatory responses: evidence from the heme oxygenase-1-deficient mouse', *The American journal of pathology*, vol. 165, no. 3, pp. 1045–1053.
- Keim, V, Willemer, S, Iovanna, JL, Adler, G & Dagorn, JC 1994, 'Rat pancreatitis-associated protein is expressed in relation to severity of experimental pancreatitis', *Pancreas*, vol. 9, no. 5, pp. 606–612.
- Kemppainen, E, Sand, J, Puolakkainen, P, Laine, S, Hedström, J, Sainio, V, Haapiainen, R & Nordback, I 1996, 'Pancreatitis associated protein as an early marker of acute pancreatitis', *Gut*, vol. 39, no. 5, pp. 675–678.

- Khan, A, Latif, S & Eloubeidi, M 2010, 'Controversies in the Etiologies of Acute Pancreatitis', *Journal of the Pancreas (Online)*, vol. 11, no. 6.
- Kong, DK, Georgescu, SP, Cano, C, Aronovitz, MJ, Iovanna, JL, Patten, RD, Kyriakis, JM & Goruppi, S 2010, 'Deficiency of the transcriptional regulator p8 results in increased autophagy and apoptosis, and causes impaired heart function', *Molecular biology of the cell*, vol. 21, no. 8, pp. 1335–1349.
- Kültz, D 2005, 'Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response', *Annual review of physiology*, vol. 67, pp. 225–257.
- Kusske, A, Rongione, A & Reber, H 1996, 'Cytokines and Acute Pancreatitis', *Gastroenterology*, vol. 110, no. 2.
- Kylänpää, L, Rakonczay, Z & O'Reilly, DA 2012, 'The Clinical Course of Acute Pancreatitis and the Inflammatory Mediators That Drive It', *International Journal of Inflammation*, vol. 2012, no. 5, pp. 1–10.
- Kylänpää, M, Mentula, P, Kemppainen, E, Puolakkainen, P, Aittomäki, S, Silvennoinen, O, Haapiainen, R & Repo, H 2005, 'Monocyte anergy is present in patients with severe acute pancreatitis and is significantly alleviated by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interferon-gamma in vitro', *Pancreas*, vol. 31, no. 1, pp. 23–27.
- Kylänpää, M, Repo, H & Puolakkainen, PA 2010, 'Inflammation and immunosuppression in severe acute pancreatitis', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 16, no. 23, pp. 2867–2872.
- Langer, HF & Chavakis, T 2009, 'Leukocyte-endothelial interactions in inflammation', *Journal of cellular and molecular medicine*, vol. 13, no. 7, pp. 1211–1220.
- Lee, JH, Wang, C & Kim, CH 2009, 'FoxP3+ regulatory T cells restrain splenic extramedullary myelopoiesis via suppression of hemopoietic cytokine-producing T cells', *Journal of immunology*, vol. 183, no. 10, pp. 6377–6386.
- Makhija, R & Kingsnorth, AN 2002, 'Cytokine storm in acute pancreatitis', *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, vol. 9, no. 4, pp. 401–410.
- Mallo, GV, Fiedler, F, Calvo, EL, Ortiz, EM, Vasseur, S, Keim, V, Morisset, J & Iovanna, JL 1997, 'Cloning and expression of the rat p8 cDNA, a new gene activated in pancreas during the acute phase of pancreatitis, pancreatic development, and regeneration, and which promotes cellular growth', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 51, pp. 32360–32369.
- Malmstrøm, M, Hansen, M, Andersen, A, Ersbøll, A, Nielsen, O, Jørgensen, L & Novovic, S 2012, 'Cytokines and Organ Failure in Acute Pancreatitis. Inflammatory Response in Acute Pancreatitis', *Pancreas*, vol. 41, no. 2.
- Mantovani, A, Bussolino, F & Dejana, E 1992, 'Cytokine regulation of endothelial cell function', *The FASEB Journal: Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 6, no. 8, pp. 2591–2599.
- Masamune, A, Watanabe, T, Kikuta, K & Shimosegawa, T 2009, 'Roles of Pancreatic Stellate Cells in Pancreatic Inflammation and Fibrosis', *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 7, no. 11, pp. S48.
- Mayerle, J 2009, 'A novel role for leucocytes in determining the severity of acute pancreatitis', *Gut*, vol. 58, no. 11, pp. 1440–1441.
- Mayerle, J, Dummer, A, Sendler, M, Malla, SR, van den Brandt, C, Teller, S, Aghdassi, A, Nitsche, C & Lerch, MM 2012, 'Differential roles of inflammatory cells in pancreatitis', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 27, pp. 47–51.
- Mayerle, J & Lerch, MM 2001, 'Course of illness in acute pancreatitis', *Deutsche Gesellschaft für Chirurgie Kongressband*.



- McKay, C, Evans, S, Sinclair, M, Carter C.R. & Imrie, C 1999, 'High early mortality rate from acute pancreatitis in Scotland, 1984-1995', *British Journal of Surgery*, vol. 86, no. 10, pp. 1302–1305.
- Menger, M, Plusczyk, T & Vollmar, B 2001, 'Microcirculatory derangements in acute pancreatitis', *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery*, vol. 8, no. 3, pp. 187–194.
- Mentula, P, Kylänpää, ML, Kemppainen, E, Jansson, SE, Sarna, S, Puolakkainen, P, Haapiainen, R & Repo, H 2004, 'Plasma anti-inflammatory cytokines and monocyte human leucocyte antigen-DR expression in patients with acute pancreatitis', *Scandinavian journal of gastroenterology*, vol. 39, no. 2, pp. 178–187.
- Mitchell, RM, Byrne, MF & Baillie, J 2003, 'Pancreatitis', *The Lancet*, vol. 361, no. 9367, pp. 1447–1455.
- Mora, A, Pérez-Mateo, M, Viedma, J, Carballo, F, Sánchez-Payá, J & Liras, G 1997, 'Activation of cellular immune response in acute pancreatitis', *Gut*, vol. 40, no. 6.
- Mössner, J 2011, 'Update Lecture: Benign Diseases of the Exocrine Pancreas', *Digestive Diseases*, vol. 29, s1, pp. 9–16.
- Motoo, Y, Watanabe, H, Yamaguchi, Y, Xie, MJ, Mouri, H, Ohtsubo, K, Okai, T, Wakabayashi, T & Sawabu, N 2001, 'Pancreatitis-associated protein levels in pancreatic juice from patients with pancreatic diseases', *Pancreatology*, vol. 1, no. 1, pp. 43–47.
- Neurath, H & Walsh, K 1976, 'Role of proteolytic enzymes in biological regulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 73, no. 11.
- Norman, JG, Fink, GW, Denham, W, Yang, J, Carter, G, Sexton, C, Falkner, J, Gower, WR & Franz, MG 1997, 'Tissue-specific cytokine production during experimental acute pancreatitis. A probable mechanism for distant organ dysfunction', *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 42, no. 8, pp. 1783–1788.
- Palsson-McDermott, EM & O'Neill, LAJ 2004, 'Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4', *Immunology*, vol. 113, no. 2, pp. 153–162.
- Pandol, SJ, Saluja, AK, Imrie, CW & Banks, PA 2007, 'Acute Pancreatitis: Bench to the Bedside', *Gastroenterology*, vol. 132, no. 3, pp. 1127–1151.
- Pastor, CM, Vonlaufen, A, Georgie, F, Hadengue, A, Morel, P & Frossard, J 2006, 'Neutrophil depletion-but not prevention of Kupffer cell activation-decreases the severity of cerulein-induced acute pancreatitis', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 12, no. 8.
- Päth, G, Opel, A, Knoll, A & Seufert, J 2004, 'Nuclear protein p8 is associated with glucose-induced pancreatic beta-cell growth', *Diabetes*, 53 Suppl 1, pp. S82-5.
- Pietruczuk, M, Dabrowska, M, Wereszczynska-Siemiatkowska, U & Dabrowski, A 2006, 'Alteration of peripheral blood lymphocyte subsets in acute pancreatitis', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 12, no. 33, pp. 5344–5351.
- Poch, B, Gansauge, F, Rau, B, Wittel, U, Gansauge S., Nüssler, A, Schoenberg, M & Beger, H 1999, 'The role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in experimental acute pancreatitis: mediators of local destruction and activators of inflammation', *FEBS Letters: Federation of European Biochemical Societies*, pp. 268–272.
- Ranson, J, Roses, D & Fink, S 1973, 'Early respiratory insufficiency in acute pancreatitis', *Annals of Surgery*, vol. 178.
- Ree, AH, Pacheco, MM, Tvermyr, M, Fodstad, O & Brentani, MM 2000, 'Expression of a novel factor, com1, in early tumor progression of breast cancer', *Clinical Cancer Research*, vol. 6, no. 5, pp. 1778–1783.

- Renner, I, Savage III, WT, Pantoja, J & Renner, V 1985, 'Death due to acute pancreatitis', *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 30, no. 10, pp. 1005–1018.
- Sah, RP & Saluja, AK 2011, 'Trypsinogen activation in acute and chronic pancreatitis: is it a prerequisite?', *Gut*, vol. 60, no. 10, pp. 1305–1307.
- Saluja, A, Hofbauer, B, Yamaguchi, Y, Yamanaka, K & Steer, M 1996, 'Induction of apoptosis reduces the severity of caerulein-induced pancreatitis in mice', *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 220, no. 3, pp. 875–878.
- Saluja, AK, Donovan E.A., Yamanaka, K, Yamaguchi, Y, Hofbauer, B & Steer, ML 1997, 'Cerulein-Induced In Vitro Activation of Trypsinogen in Rat Pancreatic Acini Is Mediated by Cathepsin B', *Gastroenterology*, vol. 113, no. 1.
- Saluja, AK, Saluja, M, Villa, A, Leli, U, Rutledge, R, Meldolesi, J & Steer, M 1989, 'Pancreatic Duct Obstruction in Rabbits Causes Digestive Zymogen and Lysosomal Enzyme Colocalization', *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 84.
- Sandoval, D, Gukovskaya, AS, Reavey, P, Gukovsky, S, Sisk, A, Braquet, P, Pandol, S & Poucell-Hatton, S 1996, 'The Role of Neutrophils and Platelet-Activating Factor in Mediating Experimental Pancreatitis', *Gastroenterology*, vol. 111, no. 4.
- Savkovic, V, Gaiser, S, Iovanna, JL & Bödeker, H 2004, 'The stress response of the exocrine pancreas', *Digestive Diseases*, vol. 22, no. 3, pp. 239–246.
- Schlesinger, MJ 1990, 'Heat shock proteins', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 265, no. 21, pp. 12111–12114.
- Shen, Y, Cui, N, Miao, B & Zhao, E 2011, 'Immune Dysregulation in Patients with Severe Acute Pancreatitis', *Inflammation*, vol. 34, no. 1, pp. 36–42.
- Shrivastava, P & Bhatia, M 2010, 'Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 16, no. 32, p. 3995.
- Spanier, B, Dijkgraaf, M & Bruno, M 2008, 'Epidemiology, aetiology and outcome of acute and chronic pancreatitis: An update', *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 22, no. 1, pp. 45–63.
- Steinberg, W, Tenner, S 1994, 'Acute Pancreatitis', *New England Journal of Medicine*, vol. 330, no. 17.
- Stephan, F, Yang, K, Tankovic, J, Soussy, C, Dhonneur, G, Duvaldestin, P, Brochard, L, Brun-Buisson, C, Harf, A & Delclaux, C 2002, 'Impairment of polymorphonuclear neutrophil functions precedes nosocomial infections in critically ill patients', *Critical Care Medicine*, vol. 30, no. 2, pp. 315–322.
- Su, SB, Motoo, Y, Iovanna, JL, Berthezene, P, Xie, MJ, Mouri, H, Ohtsubo, K, Matsubara, F & Sawabu, N 2001, 'Overexpression of p8 is inversely correlated with apoptosis in pancreatic cancer', *Clinical Cancer Research*, vol. 7, no. 5, pp. 1320–1324.
- Sweeney, KJ, Kell, MR, Coates, C, Murphy, T & Reynolds, JV 2003, 'Serum antigen(s) drive the proinflammatory T cell response in acute pancreatitis', *British Journal of Surgery*, vol. 90, no. 3, pp. 313–319.
- Takeyama, Y, Takas, K, Ueda, T, Hori, Y, Goshima, M & Kuroda, Y 2000, 'Peripheral lymphocyte reduction in severe acute pancreatitis is caused by apoptotic cell death', *Journal of gastrointestinal surgery*, vol. 4, no. 4, pp. 379–387.
- Tonsi, A, Bacchion, M, Crippa, S, Malleo, G & Bassi, C 2009, 'Acute pancreatitis at the beginning of the 21st century: The state of the art', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 15, no. 24, p. 2945.

- Ueda, T, Takeyama, Y, Yasuda, T, Takase, K, Nishikawa, J & Kuroda, Y 2002, 'Functional alterations of splenocytes in severe acute pancreatitis', *The Journal of surgical research*, vol. 102, no. 2, pp. 161–168.
- Unsinger, J, Herndon, JM, Davis, CG, Muenzer, JT, Hotchkiss, RS & Ferguson, TA 2006, 'The role of TCR engagement and activation-induced cell death in sepsis-induced T cell apoptosis', *Journal of immunology*, vol. 177, no. 11, pp. 7968–7973.
- Vasseur, S, Folch-Puy, E, Hlouschek, V, Garcia, S, Fiedler, F, Lerch, M, Dagorn, J, Closa, D & Iovanna, J 2003a, 'p8 Improves Pancreatic Response to Acute Pancreatitis by Enhancing the Expression of the Anti-inflammatory Protein Pancreatitis-associated Protein I', *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 8, pp. 7199–7207.
- Vasseur, S, Hoffmeister, A, Garcia-Montero, A, Barthet, M, Saint-Michel, L, Berthezene, P, Fiedler, F, Closa, D, Dagorn, JC & Iovanna, JL 2003b, 'Mice with targeted disruption of p8 gene show increased sensitivity to lipopolysaccharide and DNA microarray analysis of livers reveals an aberrant gene expression response', *BMC gastroenterology*, vol. 3, p. 25.
- Vasseur, S, Hoffmeister, A, Garcia-Montero, A, Mallo, GV, Feil, R, Kuhbandner, S, Dagorn, J & Iovanna, JL 2002a, 'p8-deficient fibroblasts grow more rapidly and are more resistant to adriamycin-induced apoptosis', *Oncogene*, vol. 21, no. 11, pp. 1685–1694.
- Vasseur, S, Hoffmeister, A, Garcia, S, Bagnis, C, Dagorn, J & Iovanna, JL 2002b, 'p8 is critical for tumour development induced by rasV12 mutated protein and E1A oncogene', *EMBO reports*, vol. 3, no. 2, pp. 165–170.
- Vasseur, S, Vidal Mallo, G, Fiedler, F, Bodeker, H, Canepa, E, Moreno, S & Iovanna, JL 1999, 'Cloning and expression of the human p8, a nuclear protein with mitogenic activity', *European journal of biochemistry*, vol. 259, no. 3, pp. 670–675.
- Vonlaufen, A, Wilson, JS & Apte, MV 2008, 'Molecular mechanisms of pancreatitis: Current opinion', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, vol. 23, no. 9, pp. 1339–1348.
- Waldthaler, A, Schütte, K & Malfertheiner, P 2010, 'Causes and Mechanisms in Acute Pancreatitis', *Digestive Diseases*, vol. 28, no. 2, pp. 364–372.
- Wang, G, Gao, C, Wei, D, Wang, C & Ding, S 2009, 'Acute pancreatitis: Etiology and common pathogenesis', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 15, no. 12, p. 1427.
- Ward, NS, Casserly, B & Ayala, A 2008, 'The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients', *Clinics in chest medicine*, vol. 29, no. 4, pp. 617–625.
- Weber, CK & Adler, G 2001, 'From acinar cell damage to systemic inflammatory response: current concepts in pancreatitis', *Pancreatology*, vol. 1, no. 4, pp. 356–362.
- Wilson, JS & Apte, MV 2003, 'Role of Alcohol Metabolism in Alcoholic Pancreatitis', *Pancreas*, vol. 27, no. 4.
- Wilson, PG, Manji, M & Neoptolemos, JP 1998, 'Acute pancreatitis as a model of sepsis', *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, vol. 41, pp. 51–63.
- Yasuda, T, Takeyama, Y, Ueda, T, Takase, K, Nishikawa, J & Kuroda, Y 2002, 'Splenic atrophy in experimental severe acute pancreatitis', *Pancreas*, vol. 24, no. 4, pp. 365–372.
- Zaninovic, V, Gukovskaya, A, Gukovsky, I, Mouria, M & Pandolfi, SJ 2000, 'Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells', *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 279, no. 4.

Zhang, X, Chen, H, Liu, F & Zhang, J 2009, 'Advances in researches on the immune dysregulation and therapy of severe acute pancreatitis', *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, vol. 10, no. 7, pp. 493–498.

Zhu, A, Shi, J & Sun, X 2003, 'Organ failure associated with severe acute pancreatitis', *World Journal of Gastroenterology*, vol. 9, no. 11, pp. 2570–2573.

## **7 Eigenanteilsnachweis**

Der Entwurf des Gesamtkonzeptes der Arbeit, der Hypothese sowie die Versuchsplanung erfolgten gemeinsam durch den Arbeitsgruppenleiter PD Dr. med. habil. Albrecht Hoffmeister, den gleichberechtigten Erstautor Dr. med. Sebastian Weis sowie den Promovenden Tilmann Schlaich. Nach medizinisch-technischer Einarbeitung und Laborassistenz durch Ines Sommerer bei der Etablierung der einzelnen Methoden wurden sämtliche Experimente der vorliegenden Arbeit vom Promovenden selbständig geleistet. Dies umfasste neben der Durchführung des tierexperimentellen Teils auch alle verschiedenen Methoden zur Aufarbeitung der Gewebe und Zellen im Rahmen der Studie. Das Erlernen der histologischen Methoden sowie deren mikroskopische Auswertung erfolgten durch den Promovenden unter Anleitung von Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani. Durch die Veterinärpathologin Tânia Carvalho konnte eine unabhängige histopathologische Evaluation der Pankreatitis realisiert werden. Die Bearbeitung spezieller durchflusszytometrischer Fragestellungen fand in Kooperation mit Dr. med. Stephan Fricke und Dr. rer. nat. Franka Kahlenberg statt. Die Datenerhebung fand nach jeweiliger technischer Hilfestellung in Eigenarbeit des Promovenden statt. Die statistischen Analysen führten die beiden gleichberechtigten Erstautoren durch, die akquirierten Daten wurden im Kolloquium mit der Arbeitsgruppe interpretiert.

Am Entwurf des Manuskripts und der Erstellung der Publikation waren der Erstautor und der Promovend gleichermaßen beteiligt. An der kritischen Durchsicht des Manuskripts, der inhaltlichen Diskussion sowie der graphischen Überarbeitung mitbeteiligt waren die weiteren Mitautoren Tânia Carvalho, Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani, Dr. med. Stephan Fricke, PD Dr. med. habil. Albrecht Hoffmeister und Prof. Dr. med. Joachim Mössner.

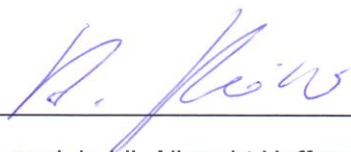
## Unterzeichnung des Eigenanteilsnachweises durch die Mitautoren



Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani




Dr. med. Stephan Fricke




PD Dr. med. habil. Albrecht Hoffmeister



Prof. Dr. med. Joachim Mössner



Tilmann Schlaich



Ines Sommerer



Dr. med. Sebastian Weis

## **8 Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

---

Datum

---

Unterschrift

## **9 Curriculum vitae**





## 10 Veröffentlichungen im Rahmen dieser Arbeit

### Publikation:

Weis, S\*, Schlaich, TC\*, Dehghani, F, Carvalho, T, Sommerer, I, Fricke, S, Kahlenberg, F, Mössner, J und Hoffmeister, A 2014 'p8 Deficiency Causes Siderosis in Spleens and Lymphocyte Apoptosis in Acute Pancreatitis', *Pancreas*, vol. 43, no. 8, pp. 1277-1285.

\*geteilte Erstautorschaft

### Posterpräsentationen:

- 9<sup>th</sup> Research Festival for Life Sciences, Leipzig, 2010

Schlaich, T., Hoffmeister, A., Mössner, J., Bechmann, I., Sommerer, I. und Weis, S. (2010): Immunphänotypisierung von p8-knock-out Mäusen. Abstract Book 9<sup>th</sup> Leipzig Research Festival for Life Sciences

- 43<sup>rd</sup> Meeting European Pancreatic Club (EPC), Magdeburg, 2011

Schlaich, T.C., Weis, S., Bechmann, I., Mössner, J. und Hoffmeister, A. (2011): Immunmodulation by p8 in Acute Pancreatitis. *Pancreatology* 2011;11:99-227

- 66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS), Leipzig, 2011

Weis, S., Schlaich, T.C., Bechmann, I., Mössner, J. und Hoffmeister, A. (2011): Immunregulation von p8 in der akuten Pankreatitis. *Z Gastroenterol* 2011; 49 – P361

- 118. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Wiesbaden, 2012

Schlaich, T., Weis, S., Dehghani, F., Bechmann, I., Mössner, J. und Hoffmeister, A. (2012): p8-abhängige Unterschiede im Immunsystem unter Caerulein-induzierter akuter Pankreatitis. *Der Internist* 2012· 53:1-115

## 11 Danksagung

Für das erfolgreiche Zustandekommen einer Dissertation bedarf es der Unterstützung von vielen Seiten, allen direkt wie indirekt beteiligten Personen gebührt mein tiefer Dank.

Herrn Prof. Dr. med. Joachim Mössner danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit im Labor seiner Klinik durchgeführt haben zu können und für die Unterstützung des Promotionsvorhabens.

Besonderer Dank gilt PD Dr. med. Albrecht Hoffmeister für eine allzeit enge und zuverlässige Betreuung, die aufgeschlossene Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, konstruktive Diskussionen und offene Gespräche über die Medizin hinaus, das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie für die erfolgreiche Förderung u.a. zur Erlangung des Promotionsstipendiums. Danke Albrecht!

Weiter möchte ich mich nachhaltig bei Dr. med. Sebastian Weis für seinen unermüdlichen Einsatz bedanken und dafür, dass er mir stets und zu jeder Tageszeit bei kleinen wie großen Problemen ein hilfreicher Ratgeber war. Seine Begeisterungsfähigkeit für die Wissenschaft hat auch mich bis zum Schluss immer wieder motivieren können, hat neue Kontakte entstehen lassen und somit großen Anteil am Entstehen dieser Arbeit.

Viel Lob und Dank möchte ich Ines Sommerer aussprechen, für ihre Geduld während meiner Einarbeitung im Labor, das umfassende Know-how sowie die hervorragende Unterstützung bei den Experimenten. Jana Lorenz und Susanne Kistner danke ich für viele aufmunternde Gespräche! Die tolle Zusammenarbeit mit Annemarie Brachmann und Angela Ehrlich (Institut für Anatomie), Kathleen Ried und Regina Scherling (zytologisches und Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik) und Stephanie Tuche (Fraunhofer-Institut für Zelltherapie und Immunologie) soll hier ebenfalls gewürdigt sein.

Bei Prof. Dr. med. Ingo Bechmann und Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani bedanke ich mich für die stets offenen Türen und die exzellente Expertise.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich von Herzen, dass sie mir meinen Weg überhaupt erst ermöglicht haben und mich seit jeher uneingeschränkt unterstützen. Zuletzt möchte ich meiner Freundin danken, die mir tagtäglich Verständnis entgegenbringt, mich zum positiven Denken animiert und immer für mich da ist.